

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE Sciences et Environnements

SPÉCIALITÉ Ecologie évolutive, fonctionnelle et des communautés

Par Guillaume DAVID

Etude des capacités de dispersion de *Monochamus galloprovincialis* vecteur du nématode du pin *Bursaphelenchus xylophilus*

Sous la direction de : Hervé JACTEL

Co-directeur : Alain ROQUES

Soutenue le 27 octobre 2014

Membres du jury :

M. BOUGET Christophe	Chargé de Recherches IRSTEA
M. GREGOIRE Jean-Claude	Professeur des Université ULB
M. DESOUHANT Emmanuel	Professeur d'Université UCBL
Mme ROBINET Christelle	Chargée de Recherches INRA
M. JACTEL Hervé	Directeur de Recherches INRA

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon jury : Jean-Claude Grégoire et Christophe Bouget pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail ainsi que Christelle Robinet et Emmanuel Desouhant pour en avoir été les examinateurs.

Je remercie mes encadrants : Hervé Jactel, Alain Roques et Dominique Piou pour m'avoir fait confiance mais aussi pour leurs nombreux conseils relectures et encouragements tout au long de ce travail de thèse.

Je remercie aussi tous mes collègues pour m'avoir supporté au quotidien pendant ces 4 dernières années et je sais que cela n'a pas toujours été facile !! Merci à Inge pour sa gentillesse et son éternelle bonne humeur. Merci à Fabrice « chucky » pour son soutien technique, pour m'avoir appris des choses que je ne pensais jamais faire comme jouer de la tronçonneuse, et pour tous nos petits bricolages à la Mc Giver ! Merci à Bastien, malgré ses goûts musicaux douteux, pour tous ces moments absurdes de la « colocation de bureau » mais aussi pour toutes nos discussions souvent utiles. Un grand merci à Maïmiti et Jean Charles pour avoir été un peu à l'origine de cette aventure en transmettant mon CV à Hervé. Merci à Yohann et Boris pour avoir partagé ces derniers mois ma condition de doctorant en fin de thèse. Merci aussi à Luc pour toutes nos discussions musique/comics/cinéma.

Je remercie également tous ceux qui m'ont aidé dans la réalisation technique de ce travail, Benjamin « Dobbie » notre petit elfe de labo, Elorri, et tout spécialement Christophe pour son aide essentielle dans la construction des manèges de vol.

Merci aussi à Edmundo, Pedro, Luis et toute leur équipe pour leur accueil chaleureux et pour m'avoir aidé à découvrir Lisbonne.

Un grand merci tout particulier à Brice pour sa participation décisive à ce travail.

Un grand merci à tous ceux qui m'ont permis de m'évader de ce travail : Thibaud, J-S, tout le club du S.A.C.S.O.

Enfin merci à mes parents et ma famille pour leur soutien indéfectible pendant toutes ces longues années d'études.

Sommaire

Chapitre I : Introduction générale.....	7
1. Les espèces invasives	10
2. Le cas du nématode du pin.....	14
3. La dispersion chez les insectes.....	24
4. Problématiques de la thèse.....	31
Chapitre II : Mise en place des capacités de vol	33
Chapitre III : Maintien des capacités de vol durant la vie adulte.....	55
Chapitre IV : Etude de la longévité de <i>M. galloprovincialis</i>	83
Chapitre V: Discussion générale et perspectives	105
1. Choix méthodologiques	106
2. Résumé des principaux résultats	107
3. Perspectives de recherche.....	115
4. Conclusions	120
Références bibliographiques.....	121
Annexe 1.....	139

Chapitre I

Introduction générale

Cette thèse porte sur l'étude des capacités de dispersion d'une espèce de Coléoptère de la famille des Cerambycids, le monochame de Provence, *Monochamus galloprovincialis*. Ce travail présente un aspect appliqué important puisque cet insecte est le vecteur du nématode du pin, *Bursaphelenchus xylophilus* en Europe. Ce nématode invasif, originaire des Etats-Unis a été introduit au Japon, en Chine, en Corée et depuis 1999 au Portugal. Dans toutes ces régions nouvellement colonisées, le nématode du pin a été responsable d'un dépérissement massif des pins, causant d'importantes pertes économiques. En Europe (Fig.1), en l'absence de mesure de gestion, les pertes s'élèveraient à 22 milliards d'euros en 22 ans (de 2008 à 2030) selon une modélisation récente de Soliman et al, (2012).

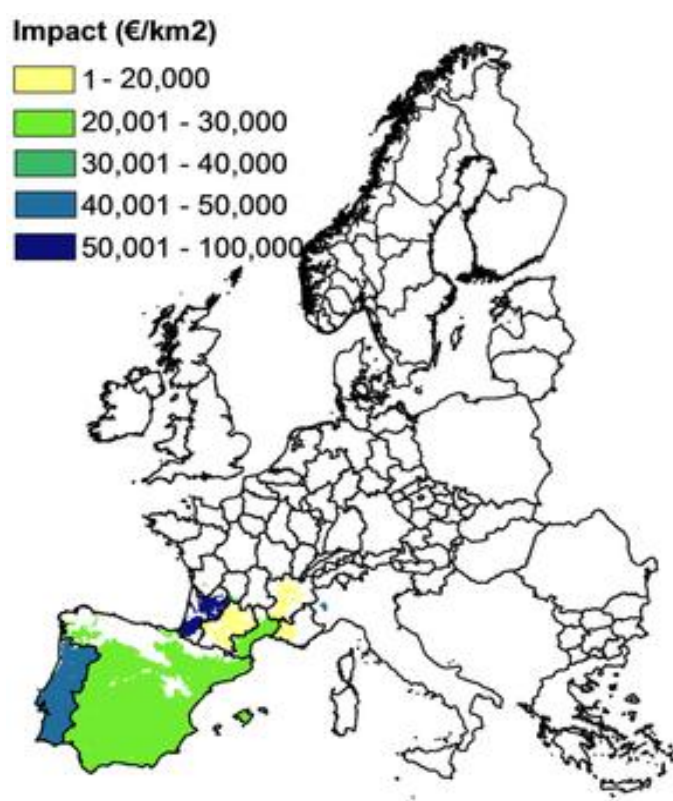


Figure 1. Estimation des coûts économiques provoqués par le nématode du pin après 22 ans de propagation non contrôlée (2008-2030). D'après Soliman et al, (2012)

B. xylophilus représente donc actuellement l'une des plus grandes menaces pour les forêts de pins en Europe. Ce risque est particulièrement important pour le massif des Landes de Gascogne qui combine trois facteurs défavorables : il est situé aux portes de l'Espagne d'où proviendra sans doute le nématode dans sa progression vers le Nord, il est constitué d'une monoculture de pins maritimes (82% de recouvrement des surfaces boisées, hors coupes

rases), l'une des essences les plus sensibles à *B. xylophilus*, et il représente la première région française pour la production de bois (10 000 km² de plantations de pins) avec une filière d'exploitation et de transformation presque exclusivement alimentée par le pin maritime et donc très exposée à une réduction de cette ressource forestière (IFN 2005).

Ce problème majeur a poussé l'Union Européenne à financer le projet REPHRAME (Research Extending Plant Health Risk And Monitoring Evaluation, FP7, 2010-2014). Ce projet de recherche a impliqué 11 partenaires issus de 8 pays (Allemagne, Autriche, Chine, Espagne, France, Norvège, Portugal, Royaume-Uni). Ses principaux objectifs étaient de mieux comprendre les interactions entre *B. xylophilus*, *M. galloprovincialis* et leurs différents arbres hôtes, mieux prédire l'expansion future du nématode en Europe, évaluer ses conséquences pour les écosystèmes forestiers et envisager des méthodes de lutte ou de prévention.

Cette thèse s'inscrit dans ce projet où notre groupe d'entomologie forestière (INRA, umr BIOGECO) était en charge d'une tâche portant sur l'étude des capacités de dispersion de l'insecte vecteur *M. galloprovincialis*. Notre but était de fournir des informations permettant de mieux comprendre et à terme de mieux modéliser la propagation de la maladie. Cependant, au delà de la caractérisation des performances et du comportement de vol de cet insecte, nous avons souhaité tester plusieurs hypothèses plus théoriques, notamment sur les stratégies d'allocation de l'énergie entre les fonctions de dispersion et de reproduction qui sont deux processus essentiels à la survie des espèces et à la dynamique de leurs populations.

Dans cette introduction, nous aborderons donc : ❶ la question des espèces invasives ; ❷ le cas du nématode du pin ainsi que les interactions avec son vecteur ; ❸ la dispersion et les compromis d'allocation de l'énergie entre cette fonction et la reproduction ; puis ❹ l'énoncé des grands objectifs de ce travail et une présentation de la structure de ce manuscrit.

1. Les espèces invasives

Les espèces invasives sont aujourd'hui, considérées comme la deuxième cause de perte de biodiversité, après la destruction des habitats (Wilcove et al., 1998). Il est en effet actuellement admis que la majorité des invasions biologiques d'espèces exotiques représente une importante menace pour la biodiversité indigène notamment en raison de processus de prédation, de compétition et de modifications des habitats (Mack et al., 2000; Vitousek et al., 1996). Par exemple, d'après Alsop and Laughlin (1991), le puceron lanigère du sapin (*Adelges piceae*) détruit actuellement les forêts d'épinettes et de sapins dans plusieurs régions des Etats-Unis. En 20 ans, il s'est répandu dans le sud des Appalaches et a détruit jusqu'à 95% des sapins (Pimentel et al., 2005). Alsop and Laughlin (1991) rapportent également que deux espèces d'oiseaux natives de ces forêts ont alors disparu, suite à la destruction de leur habitat. Un autre exemple est la fourmi *Solenopsis invicta* qui, introduite aux Etats-Unis, a décimé les populations de plusieurs espèces locales d'oiseaux, lézards et serpents (Pimentel et al., 2005). Les espèces invasives, en plus de leur effet néfaste sur la biodiversité, peuvent provoquer elles-mêmes des dégâts importants avec un coût économique considérable. Aux Etats-Unis, les pertes annuelles pour l'industrie forestière sont estimées à plus de 4.2 milliards de dollars (Pimentel, 2002) alors qu'en Chine elles s'élèvent à 2.2 milliards (Higgins et al., 2000) et à 9.6 milliards au Canada (Colautti et al., 2006).

Le phénomène d'invasion est considéré comme un phénomène naturel qui structure les écosystèmes (Shigesada and Kawasaki, 1997). Ce qui est nouveau, c'est l'augmentation brutale de la fréquence des invasions biologiques au cours des 100 dernières années (Liebhold et al., 1995). Un phénomène qui semble clairement lié au développement des activités humaines. Cette brusque augmentation suit en effet celle du rythme des échanges commerciaux, du transport et du tourisme entre les différents continents (Kolar and Lodge, 2001). Par exemple, la fréquence des invasions biologiques dans les îles Hawaï était de 30 espèces par million d'années (0,00003 / an) avant l'implantation de l'homme dans l'archipel. Elle est passée à 20000 espèces par million d'années (0,02 / an) après l'arrivée des Polynésiens et a continué d'augmenter pour atteindre actuellement environ 20 / an, soit quasiment un million de fois plus que la fréquence observée avant l'influence humaine (Loope et al., 1988). De la même manière, 80% des espèces d'insectes introduites en Europe l'ont été après les années 50 (Essl et al., 2011). L'augmentation des activités humaines a ainsi

aidé à surmonter les barrières naturelles (océans, montagnes) qui participaient à la structuration des espèces (Mayr, 1963)

Une invasion biologique par une espèce est un phénomène qui se déroule en trois étapes : l'introduction, l'établissement puis l'expansion géographique de l'espèce dans une zone qui ne fait pas partie de son aire naturelle de distribution (Mack et al., 2000; Richardson et al., 2000).

❶ L'introduction correspond à l'arrivée dans un nouvel habitat. Elle est souvent due aux activités humaines, notamment les échanges commerciaux. Ainsi, la plupart des Cerambycidae invasifs comme *Agilus planipennis* ont été introduits ou a été introduit ? par l'intermédiaire de bois d'emballage (Brockerhoff et al., 2013).

❷ L'étape suivante, l'établissement, se définit comme l'opposé de l'extinction, et donc par le maintien de manière durable d'une population dans un habitat donné pendant plusieurs générations (Liebhold and Tobin, 2008). Cette étape est très importante pour la gestion des espèces invasives. En effet, les mesures d'éradication souvent utilisées pour lutter contre ces espèces visent à interrompre cette phase en forçant l'extinction de ces nouvelles populations avant qu'elles n'entament la troisième phase, en se fondant notamment sur l'effet Allee. Elles cherchent ainsi à réduire la densité de la population introduite en dessous du seuil nécessaire à son maintien (Liebhold and Tobin, 2008)

❸ Une fois qu'une population est établie, sa densité peut augmenter l'obligeant à étendre son aire de distribution via la colonisation de nouveaux habitats favorables. Cette troisième phase d'expansion est, pour beaucoup d'invasions biologiques, la seule étape directement observable. Dans le cas de ravageurs (insectes, champignons, nématodes, etc.), c'est souvent pendant cette phase que les symptômes de dépérissement apparaissent de manière notable. Par exemple, aux Etats-Unis, Hack and McCullough (1993) rapportent que le scolyte *Tomicus piniperda* avait déjà eu le temps de coloniser six états avant que ne soient remarquées d'importantes mortalités de pin sylvestre.

L'expansion d'une espèce suit le plus souvent un processus de dispersion dit "stratifié" (Liebhold and Tobin, 2008), principalement contrôlé par deux phénomènes. Le premier est une dispersion continue à courte distance, majoritairement due à la croissance de la population ainsi qu'aux capacités de dispersion de l'espèce (Liebhold et al., 1995). Le second est une dispersion à longue distance, réalisée à l'aide de mouvements de populations souvent aléatoires et liés à des mécanismes totalement différents de ceux affectant la dispersion courte

distance. Par exemple en Amérique du Nord, le puceron lanigère de la pruche est transporté sur de longues distances par des oiseaux migrateurs (McClure, 1990). Un autre exemple de dispersion stratifiée est le cas de *Lymantria dispar* toujours en Amérique du Nord. Sa dispersion courte distance est réalisée durant les premiers stades larvaires grâce au vent tandis que sa dispersion à longue distance est assurée par le transport accidentel de larves par l'homme (Whitmire and Tobin, 2006). En France, il a également été montré que la processionnaire du pin pouvait étendre son aire de distribution grâce à une dispersion longue distance probablement assurée par le transport par l'homme d'arbres en pot contenant des individus se nymphosant dans la terre (Robinet et al., 2012).

Bien connaître ces deux processus semble ainsi nécessaire pour comprendre et pouvoir prédire le déroulement d'une invasion biologique. Cependant, à cause de l'aspect aléatoire et difficilement prévisible de la dispersion à longue distance, nous nous intéresserons ici exclusivement à la dispersion courte distance, propre à l'espèce étudiée. La compréhension de ses capacités de dispersion est alors essentielle pour la surveillance des zones potentiellement colonisées (Evans et al., 1996; Økland et al., 2010). En effet, il semble très important de déterminer le mode de dispersion des espèces invasives et ou de leur vecteur. Par exemple, s'il est actif et principalement déterminé par le vol comme pour le Cerambycidae invasif *Anoplophora glabripennis* (Smith et al., 2001) ou s'il est passif comme pour les larves de *L. dispar* transportées par le vent (Whitmire and Tobin, 2006). De même, il est crucial de savoir si les performances de dispersion de l'espèce sont fortes ou faibles et s'il existe une variabilité intra-population de ces capacités. Par exemple (Smith et al., 2001) ont montré grâce à une expérience de marquage - lâcher - recapture que *A. glabripennis* n'était capable de parcourir que 266 m par semaine en moyenne mais que 2% des distances de vol enregistrés étaient supérieurs à un kilomètre. Déterminer si ce sont les mêmes individus ou pas qui sont capables d'exprimer des comportements de dispersion différents ou encore si les capacités de dispersion varient avec l'âge ou l'état physiologique des individus (Hastings, 1992) semble donc utile pour pouvoir optimiser les mesures de détection ou de suivi de l'expansion des espèces invasives.

Un autre aspect important pour mieux comprendre les phénomènes d'invasion est d'étudier la réponse des espèces exotiques au changement climatique. Walther et al., (2009) ont en effet montré que le réchauffement climatique pouvait affecter l'ensemble des étapes de l'invasion (Fig.2). Tout d'abord, le changement climatique peut rendre accessible de

nouvelles zones à coloniser et ainsi faciliter les phases d'arrivée et d'expansion. L'augmentation des températures rend par exemple certains territoires plus propices à l'installation d'espèces exotiques originaires des régions subtropicales. C'est notamment le cas du moustique tigre, *Aedes albopictus*, originaire d'Asie du Sud Est. Le réchauffement climatique pourrait lui permettre d'étendre encore plus son aire de distribution en Europe (Fischer et al., 2011). Il peut également augmenter les performances des espèces (Parmesan and Yohe, 2003), en leur permettant de se reproduire plus vite ou plus efficacement, ce qui favorise leur établissement, ou de maximiser leur capacité de dispersion. En effet, le vol étant dépendant de la température (Taylor, 1963) le réchauffement climatique peut rendre cette activité plus fréquente dans les régions où l'insecte est déjà présent leur permettant également d'étendre leur aire de distribution.

Des études récentes ont cependant montré que l'augmentation de la variabilité des températures et l'augmentation de la fréquence d'événements climatiques extrêmes avaient au contraire des effets négatifs sur les performances des insectes (Vasseur et al., 2014).

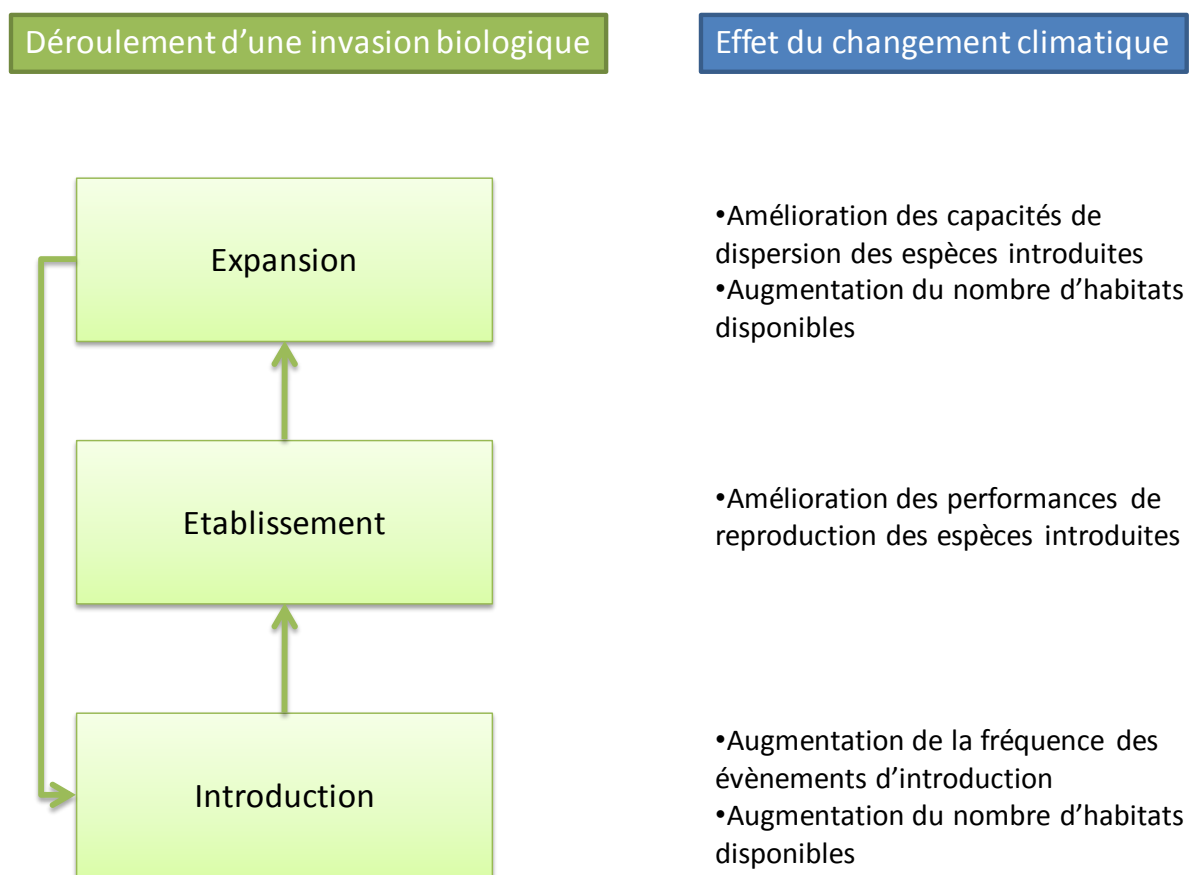


Figure 2. Effet du changement climatique sur le déroulement d'une invasion biologique, d'après Walther et al. 2009

2. Le cas du nématode du pin

2.1. Historique de la propagation de *Bursaphelenchus xylophilus*

Le nématode du pin, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner and Buhrer 1934) Nickle 1970 est responsable de la maladie du flétrissement des pins (*Pine Wilt Disease*, PWD). Cette maladie constitue actuellement l'une des menaces les plus importantes pour les forêts de pins du monde entier (Evans et al., 1996).

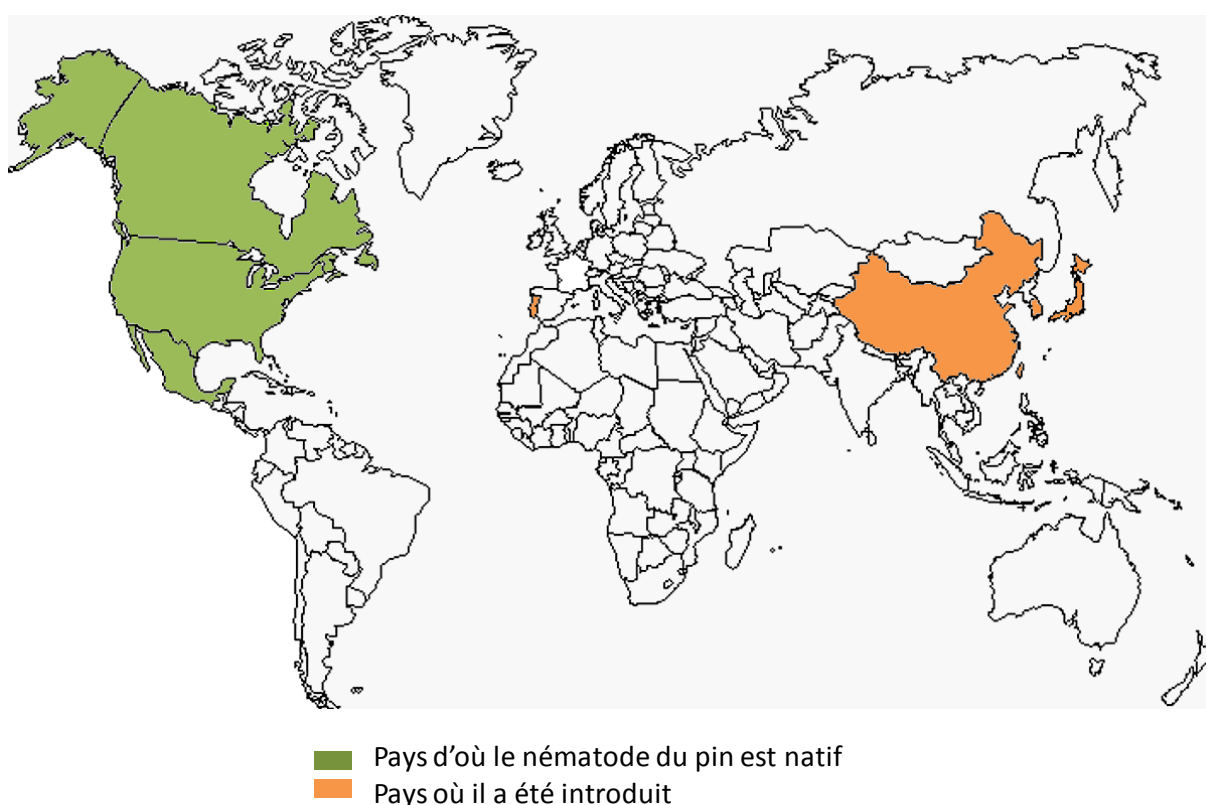


Figure 3 Carte de répartition actuelle de *Bursaphelenchus xylophilus*

Dans son aire d'origine, l'Amérique du Nord, le nématode ne cause que peu de dégâts car les espèces locales de pins ont co-évolué avec lui et présentent des mécanismes de résistance. Par exemple, des substances nématocides ont été identifiées dans le bois de cœur et l'écorce de *Pinus massoniana*, *Pinus strobius* et *Pinus palustris*. Par contre, dans les pays d'introduction, où les espèces locales de pins ne sont pas naturellement résistantes, *B. xylophilus* est responsable de mortalités massives. Le nématode a d'abord été introduit au Japon au début du 20^{ème} siècle (Mamiya, 1988). En 1984, soit environ 80 ans après son introduction, près de 25% (650 000 hectares) des forêts japonaises étaient infestées par le

nématode du pin (Mamiya, 1987). La perte annuelle en bois atteignait alors une valeur maximale de 2 430 000 m³ (Mamiya, 1988). En 2006 au Japon, cette perte de bois était encore comprise entre 700 000 et 900 000 m³ (Togashi and Shigesada, 2006). Le nématode du pin s'est ensuite propagé en Chine (Nanjing, Province de Jiangsu) (Cheng et al., 1983), puis à Taïwan, et en Corée du Sud (Yi et al., 1989) causant des dommages considérables dans toutes les forêts de pins de ces régions. En 1999, il a été découvert au Portugal sur *P. pinaster*, dans 2 régions au Sud de Lisbonne (Herdade Moinho Novo et Herdade Vale de Landeira), près de la zone portuaire de Sétubal (Mota et al., 1999) et depuis s'est répandu dans l'ensemble du pays. En 2008, 2010 et 2012 des foyers ont été détectés et éradiqués en Espagne respectivement en Estrémadure, en Galice et en Castille (Anonymous, 2013). Soliman et al. (2012) ont estimé que le coût total de la perte de bois engendrée par le nématode en Europe pourrait atteindre 22 milliards d'Euros sur une période de 22 ans (2008-2030).

Aux Etats-Unis, les mortalités dues au dépérissement provoqué par le nématode sur les espèces de pins exotiques, principalement européennes, comme *P. sylvestris* et *P. nigra*, augmentent également, particulièrement après des périodes de sécheresse (James et al., 2006). Mieux comprendre la biologie et l'écologie de cette espèce de nématode représente donc un enjeu majeur pour la protection des forêts de pins d'Europe.

2.2. Le cycle biologique de *Bursaphelenchus xylophilus*

Le cycle biologique du nématode du pin est composé de deux phases, l'une dite « propagative » et l'autre dite « dispersive ». La première phase se déroule dans des arbres sains lorsque la ressource alimentaire n'est pas limitante. Les nématodes se nourrissent alors des cellules épithéliales qui tapissent les canaux résinifères ainsi que du parenchyme des tissus conducteurs de l'arbre (xylème). Après s'être reproduit, les nématodes adultes pondent des œufs. Il s'en suit un développement larvaire composé de quatre stades qui durent quatre à cinq jours sur une culture de *Botrytis cinerea* à 21°C (Futai, 2013). La prolifération des nématodes au détriment des cellules parenchymateuses provoque l'embolie des vaisseaux conducteurs (cavitation) ce qui aboutit à l'arrêt du flux de sève brute. C'est cet arrêt de la circulation d'eau qui est responsable du flétrissement conduisant à la mort rapide de l'arbre (Kuroda, 2008). La maladie n'est pas visible au début de la présence du nématode et les symptômes se manifestent soudainement, environ 3 à 4 semaines après l'infestation, par un jaunissement des pousses, le développement de champignons du bleuissement du bois et la

mort de l'arbre (5 à 6 semaines après l'infestation) (Futai, 2013; Mamiya et al., 1984; Naves et al., 2007). Cependant, ces symptômes ne sont pas spécifiques à la présence du nématode du pin puisque d'autres facteurs comme la sécheresse ou les attaques de scolytes peuvent avoir des effets similaires sur l'arbre (Naves et al., 2007).

Une fois l'arbre mort, la deuxième phase dite « dispersive » commence. Elle est déclenchée par des conditions non favorables au développement des nématodes comme par exemple en cas de surpopulation ou lorsque le bois devient trop sec, empêchant les nématodes d'y circuler. Dans ces conditions, des individus présentant des caractéristiques particulières apparaissent au troisième stade larvaire. Ce sont des larves dites « Dauer » (Kondo and Ishibashi, 1978). Ces larves présentent une cuticule plus épaisse ainsi que des réserves lipidiques plus importantes leur permettant de résister à ces conditions difficiles jusqu'à ce qu'elles trouvent un vecteur qui les transporte vers un nouvel arbre où elles pourront reprendre leur cycle.

2.3. Transmission de la maladie : l'importance d'un vecteur

En 1978, il a été montré au Japon que la maladie pouvait se déplacer de plusieurs kilomètres par an (Futai, 2013). Sans un vecteur, les capacités de déplacement du nématode seul, avec ses faibles dimensions, approximativement 0.85 mm de long et 20 µm de large (Mamiya and Kiyohara, 1972) ne pouvaient pas expliquer la propagation à grande ou moyenne échelle de la maladie. Le nématode ne pouvant pas passer seul d'un arbre mort à un arbre sain. De nombreuses études ont donc été réalisées en Asie afin de déterminer ses vecteurs potentiels. Après avoir étudié près de 60 espèces d'insectes vivant dans les pins dépérissant, le longicorne *Monochamus alternatus* (Coleoptera : Cerambycidae) s'est révélé être le principal vecteur pour le transport d'un arbre mort ou dépérissant vers un arbre sain (Mamiya, 1972). Par la suite, le même type d'études a été réalisé dans les différentes régions du monde où la maladie était révélée. Les principaux vecteurs se sont toujours avérés être des espèces de *Monochamus* : *M. alternatus* (Hope, 1842), *M. saltuarius* (Gebler, 1830) au Japon, en Chine et Corée (Li et al., 2007), *M. carolinensis* (Olivier, 1975), *M. mutator* (LeConte, 1873), *M. scutellatus* (Say, 1824) et *M. titillator* (Fabricius, 1787) en Amérique du Nord (Linit, 1990) et *M. galloprovincialis* en Europe (Sousa et al., 2001).

Cependant, ces espèces de longicorne n'étant pas considérées elles-mêmes comme des ravageurs, peu de choses étaient connues sur leur biologie et leur écologie avant l'arrivée du nématode (Akbulut and Stamps, 2012).

2.4. Biologie de *Monochamus* sp.

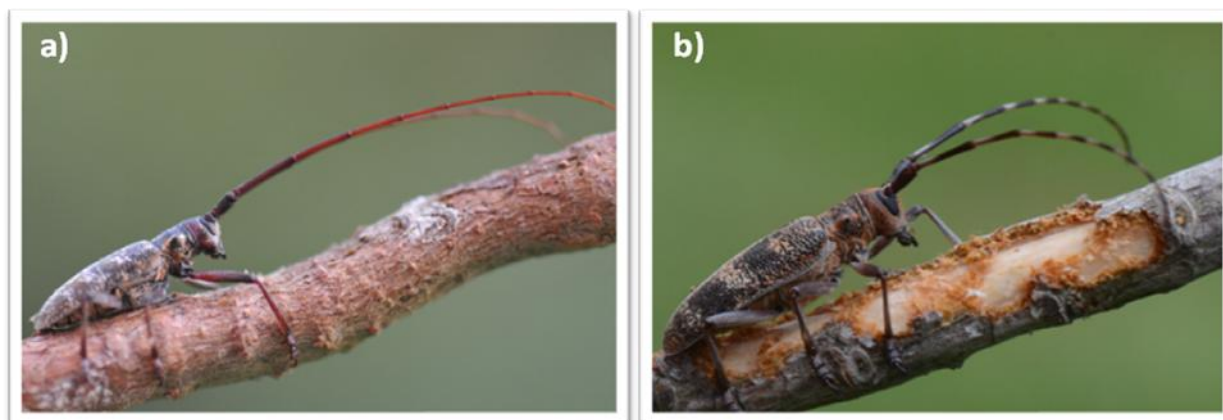


Figure 4. *Monochamus galloprovincialis* a) mâle, b) femelle lors d'un repas de maturation (photo I.van Halder)

Les espèces du genre *Monochamus* appartiennent à l'ordre des Coléoptères, famille des Cerambycidae, sous famille des Lamiinae et tribu des Monochamini (LeConte, 1873). Ce genre contient 127 espèces réparties entre l'Amérique du nord, l'Europe, l'Asie et l'Afrique (Anonymous, 2014). En Europe, il en existe cinq espèces (*M. galloprovincialis*, *M. saltuarius*, *M. sartor* (Fabricius, 1787), *M. sutor* (Linnaeus, 1758), *M. urussovi* (Fischer, 1806). Mais dans cette thèse, nous nous sommes intéressés exclusivement à *M. galloprovincialis* (Olivier) (fig.4). En effet, c'est l'espèce la plus fréquente en France et c'est également la seule pour laquelle le transport puis l'inoculation de *B. xylophilus* dans de nouveaux arbres sains ont été démontrés (Sousa et al., 2001).

La biologie et l'écologie des espèces de *Monochamus* en Europe sont proches de celles des espèces de ce genre présentes en Amérique du Nord et en Asie (Akbulut et al., 2004; Akbulut and Stamps, 2012; Togashi, 1990a). Les *Monochamus* appartiennent aux espèces xylophages secondaires c'est-à-dire qu'ils se développent dans le bois d'arbres dépérissants ou morts. En effet, ces insectes exigent pour pondre du bois mort récemment et présentant ainsi une écorce et un phloème "frais" (contenant encore de la sève), essentiels aux premières phases du développement larvaire. Par conséquent, ils ne pondent généralement pas dans la

branche ou le tronc où ils se sont développés. La plupart des espèces de *Monochamus* ont une génération par an mais ce nombre peut varier de 0.5 à 3 selon les conditions de température (Akbulut and Stamps, 2012). Les œufs sont déposés durant l'été dans des encoches réalisées dans l'écorce par la femelle à l'aide de ses mandibules. Les larves de *Monochamus* creusent ensuite des galeries individuelles dans le phloème, entre l'écorce et l'aubier, et vers la fin de leur développement s'enfoncent dans le xylème pour y établir leur loge nymphale. Les premiers stades larvaires ont lieu pendant la fin de l'été et durant l'automne. Durant cette période, les larves s'alimentent en consommant les tissus conducteurs contenant encore de la sève élaborée (phloème). C'est pendant ces premiers stades que la mortalité des larves est la plus importante (Naves et al., 2008). En effet, elles sont encore accessibles aux oiseaux comme les pics (Kishi, 1995) et aux parasitoïdes comme *Cyanopterus flavator* (Naves et al., 2005) qui constituent la majorité de leurs ennemis naturels (Tomminen, 1993). Pendant cette période, elles sont également en compétition entre elles pour le substrat de développement ou alors exposées au cannibalisme (Naves et al., 2008). Elles entrent aussi en compétition avec d'autres insectes occupant la même niche écologique comme les scolytes ou d'autres cérambycidés comme les *Acanthocinus* ou certains buprestes. Cependant, d'après (Naves et al., 2008) la plus grande cause de mortalité reste les champignons entomophages comme *Beauveria bassiana* pour *M. alternatus* au Japon (Kishi, 1995)

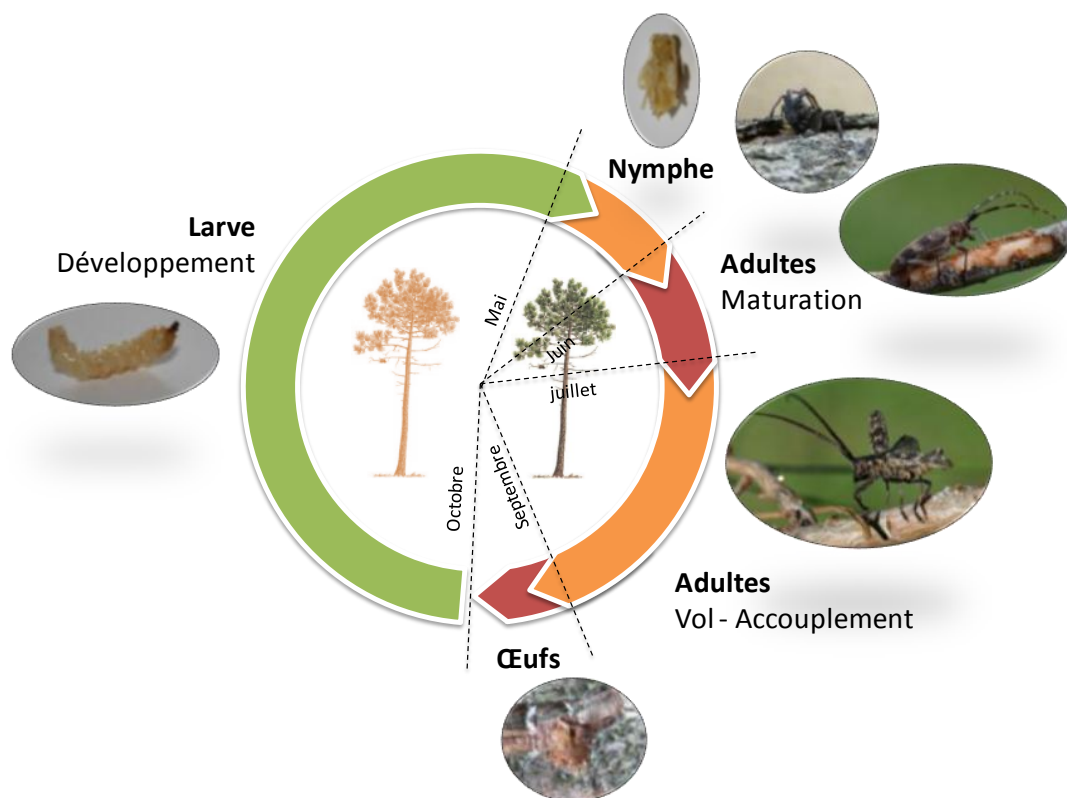


Figure 5. Cycle biologique de *Monochamus galloprovincialis* en Aquitaine

A la fin de l'automne, les larves du dernier stade larvaire creusent dans l'aubier une galerie qu'elles colmatent au fur et à mesure de leur avancement avec les copeaux qu'elles excavent. De cette manière, elles s'isolent des variations de températures extérieures et surtout du froid. Elles aménagent une loge nymphale où elles vont hiverner (P. M. Naves et al., 2007). Au printemps, elles se nymphosent et les nouveaux adultes émergent du bois mort en creusant une galerie qui se termine par des trous de sortie de forme circulaire très typique. Les émergences sont observées, au Portugal, à partir du mois de mai avec un pic entre juin et juillet mais peuvent parfois s'étendre jusqu'en septembre (Naves et al., 2008). Contrairement aux larves qui se nourrissent de bois mort, les adultes, eux, se nourrissent exclusivement de la sève élaborée dans le phloème de pousses fraîches en pratiquant de larges morsures dans l'écorce (Fig. 4). L'émergence est en effet suivie d'une période de maturation durant laquelle les jeunes adultes doivent s'alimenter afin d'acquérir l'énergie nécessaire au développement complet des organes reproducteurs (Katsuyama et al., 1989). D'après (Naves et al., 2006) cette période dure une vingtaine de jours chez *M. galloprovincialis*.

Une fois leur maturation achevée, les individus se consacrent essentiellement à la reproduction et donc à la recherche de sites de ponte, c'est-à-dire d'arbres dépérissants. Ne possédant pas de phéromones attractives à longue distance (Allison et al., 2004), les adultes des deux sexes utilisent les volatiles émis par les pins afin de se rencontrer sur l'arbre hôte. En effet, il a été montré que *M. galloprovincialis* utilisait comme kairomones l' α -pinène, l'un des principaux composant de la résine de pin mais aussi des phéromones de scolytes comme l'ipsenol et l'ipsdienol, tous les deux révélateurs d'arbres dépérissants ou déjà infestés par des espèces xylophages primaires (Ibeas et al., 2008, 2007; Pajares et al., 2004). En plus de ces kairomones, les femelles semblent être attirées par un hydrocarbure produit par les mâles, le 2-undecyloxy-1-ethanol, qui pourrait leur permettre de se localiser à courte distance, une fois posé sur l'arbre hôte (Ibeas et al., 2008; Pajares et al., 2010).

2.5. Relations entre le nématode et son insecte vecteur

Bursaphelenchus xylophilus a donc absolument besoin d'un organisme vecteur pour pouvoir passer d'arbre en arbre lors de sa phase « dispersive ». Il a été montré que les larves « Dauer » de nématode au troisième stade larvaire avaient la possibilité de détecter la présence des nymphes de *Monochamus* grâce à des volatiles émis par ces dernières (Futai, 2013). Elles s'agrègent donc autour des loges de nymphose puis une fois la métamorphose des insectes terminée, d'autres stimuli déclenchent le passage des larves « Dauer » de *B. xylophilus* du stade 3 au stade 4. C'est sous cette forme que les nématodes rentrent dans l'insecte (Necibi and Linit, 1998). Aikawa et al., (2000) a montré que les nématodes se situaient principalement au niveau des trachées de l'insecte. Une fois leur développement terminé, les jeunes adultes de *Monochamus*, encore immatures, peuvent donc émerger du bois chargé en nématodes si leur substrat de développement en contenait. Les mécanismes de transfert des nématodes de l'insecte vecteur vers un nouveau pin sont mal connus. Les études de Stamps et Linit (1998; 2001) ont cependant montré que la sortie des nématodes de l'insecte résultait d'une interaction complexe entre des facteurs endogènes et des facteurs exogènes, notamment en réponse à une diminution de la réserve lipidique des larves « Dauer ». Selon ces auteurs, cette diminution se produit deux semaines ou plus après l'émergence des insectes vecteurs de leur arbre hôte. Elle entraîne une modification de la réponse des nématodes aux stimuli externes, dont une augmentation de l'attraction vis-à-vis des substances volatiles des pins, tel que le β -myrcène, conduisant à la sortie des nématodes de l'insecte vecteur et le passage sur le pin-hôte.

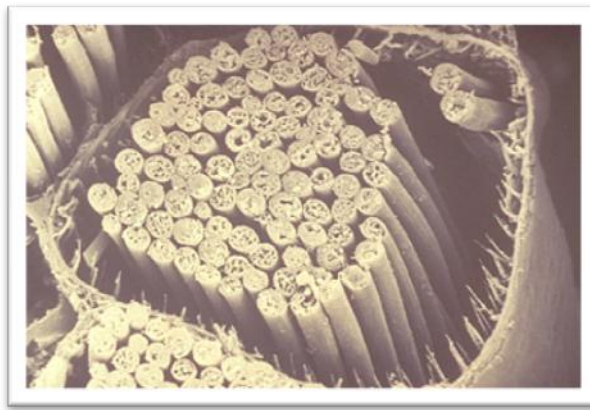


Figure 6 .*B. xylophilus* dans les trachées de *Monochamus carolinensis*

<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/nematodes/pages/pinewilt.aspx>, M. Linit (2013)

Pendant la phase « dispersive », le coléoptère peut inoculer le nématode du pin en deux principales occasions. La première intervient lors de sa période de maturation lorsque l'insecte se nourrit sur des pousses d'arbres sains (Naves et al., 2007). D'après Naves et al. (2007) cette période dure en moyenne six semaines. Cette étape est la plus importante puisque le nématode est alors transmis à de nouveaux arbres sains lui permettant ainsi de recommencer son cycle.

La deuxième occasion intervient lors de la ponte. En effet, il a été constaté que les femelles de *Monochamus* pouvaient transmettre encore quelques nématodes dans des arbres dépérissants ou déjà morts lors de l'insertion des œufs dans les encoches de ponte (Edwards and Linit, 1991). Cette transmission n'engendre pas directement de mortalité de l'arbre déjà dépérissant mais les insectes de la génération suivante, qui se seront développés dans ce bois contaminé, peuvent alors transmettre la maladie à des arbres sains l'année suivante et donc participer de manière significative à la poursuite de la propagation du nématode.

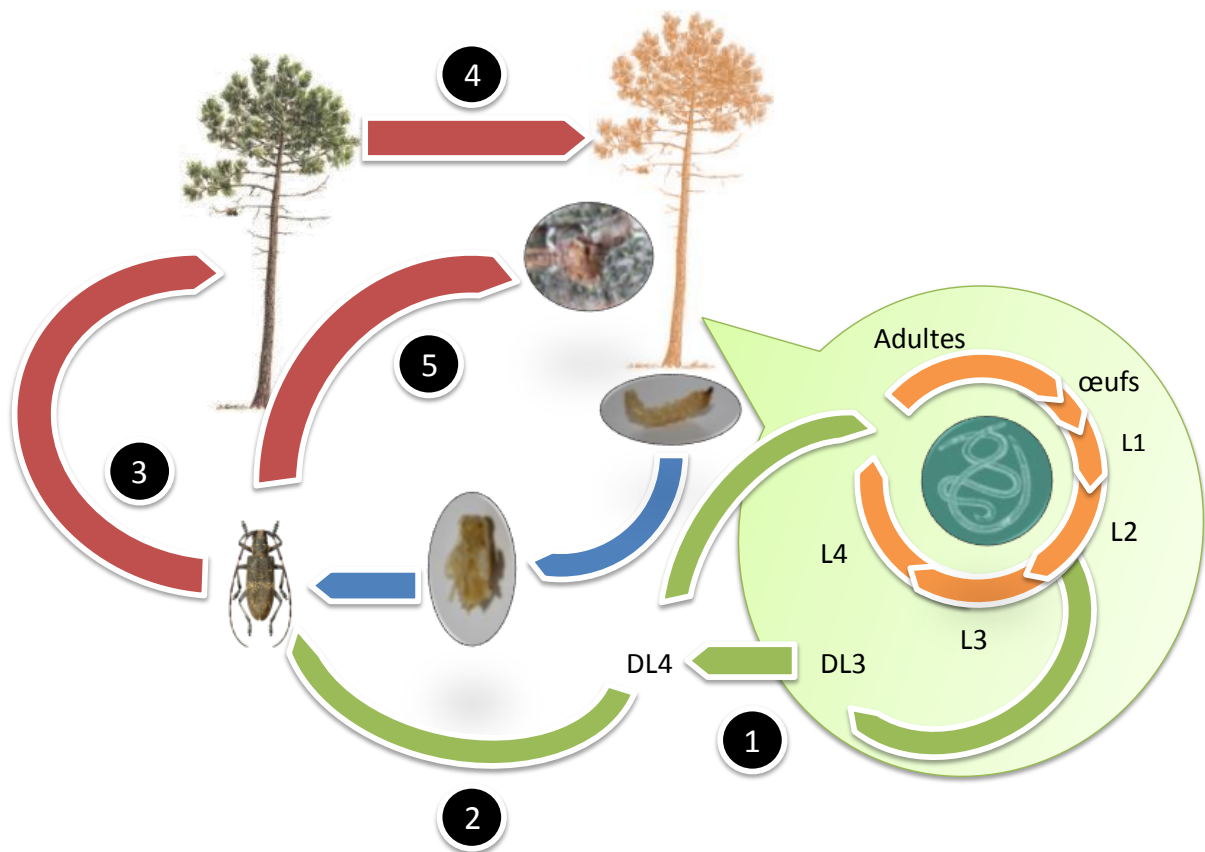


Figure 7. Interactions entre le cycle biologique du nématode *B. xylophilus* et celui de son vecteur, *M. galloprovincialis*. **1** Les larves Dauer de troisième stade s'agrègent autour des chambres de nymphose des *Monochamus*. **2** Les larves Dauer de troisième stade passe au quatrième stade et rentrent dans le système respiratoire des adultes immatures de *Monochamus* nouvellement émergés **3** L'inoculation primaire des nématodes sur des arbres sains intervient lors de repas de maturation des insectes vecteurs **4** Le dépérissement intervient suite à la prolifération des nématodes **5** Une inoculation secondaire peut intervenir sur des arbres morts ou dépérissant lors de la ponte par *Monochamus*.

2.6. Gestion actuelle de la maladie en Europe

En 1996, une analyse de risque (Pest Risk Analyses, PRA), étendue à l'ensemble de l'Union Européenne, a démontré qu'il existait cinq espèces endémiques de *Monochamus* (*M. galloprovincialis*, *M. sutor* (Linnaeus, 1758), *M. sartor* (Fabricius, 1787), *M. urusovi* (Fischer, 1806) et *M. saltuarius*) potentiellement vectrices du nématode du pin (Evans et al., 1996). De plus, plusieurs essences de pins fréquentes en Europe ont été considérées comme sensibles à la maladie (Evans et al., 1996) : *Pinus nigra*, *P. pinaster*, *P. sylvestris* et *P. halepensis*. Suite à cette étude, *B. xylophilus* a été classé parmi les organismes de quarantaine pour l'Union Européenne (Evans et al., 1996). Cette décision a entraîné la prise de mesures préventives, en particulier pour les importations de bois. Cependant, depuis la découverte du nématode au Portugal en 1999 et la détection de nouveaux foyers en Espagne, le problème est devenu une question très sensible pour les états membres.

Une décision d'exécution a donc été émise par la commission Européenne le 26 septembre 2012. Elle demande aux Etats membres de se focaliser sur la veille et la prévention de la propagation du nématode du pin. Tous les états membres doivent mettre en place un programme de dépistage consistant en un piégeage des insectes ainsi qu'une collecte d'échantillons végétaux qui sont ensuite analysés en laboratoire pour déterminer la présence de *B. xylophilus*. Lorsqu'un échantillon est déclaré positif, il déclenche la mise en place d'un plan d'urgence. Il correspond en pratique à la mise en œuvre de coupes rases dans un rayon de 500 m autour de chaque arbre contaminé ainsi qu'en la mise en place d'une zone tampon d'un rayon de 20 km autour du centre de la zone de coupe. Cette zone tampon est une zone dans laquelle la surveillance de l'apparition de nouveaux symptômes est particulièrement renforcée pendant une durée d'au moins quatre ans si aucun nouveau dépérissement suspect n'est découvert.

3. La dispersion chez les insectes

Nous avons vu précédemment que les capacités de dispersion étaient très importantes pour la phase d'expansion d'une espèce invasive. Dans le cas du nématode du pin, sa dispersion est entièrement dépendante du comportement et des capacités de dispersion de son insecte vecteur. Nous avons donc décidé de concentrer ce travail de thèse sur l'estimation des capacités de dispersion ainsi que sur leur évolution avec l'âge chez l'insecte vecteur *M. galloprovincialis*. En effet, étudier les performances de vol en fonction de facteurs endogènes comme le sexe (Senger et al., 2007), la taille (Boggs and Freeman, 2005) et l'âge (Hughes and Dorn, 2002) ou l'état physiologique (notamment avant et après maturation sexuelle) présente un intérêt appliqué certain pour mieux comprendre et prédire l'expansion du nématode et les événements d'inoculation. Jusqu'à présent peu d'informations sur les capacités de vol de cet insecte étaient disponibles (Gallego et al., 2012; Mas et al., 2013). Les capacités de dispersion des espèces américaines (*M. carolinensis*) et asiatique (*M. alternatus*) avaient été estimées entre 2 et 3 km (Linit et al., 2004; Takasu et al., 2000) cependant la taille des insectes (15-28 mm × 4-9 mm pour *M. alternatus* (Ciesla, 2001) vs. 14-35 mm × 5-9 mm pour *M. galloprovincialis*) et la configuration des paysages où ils évoluent étant différentes, il semblait risqué d'extrapoler ces résultats à *M. galloprovincialis*.

Ce travail nous a fourni également l'occasion d'étudier des aspects plus théoriques concernant la mise en place des capacités de vol chez un insecte longévif ainsi que le compromis d'allocation d'énergie nécessaire entre la dispersion et la reproduction, qui sont les deux fonctions biologiques les plus importantes pour le maintien et l'évolution des populations d'insectes (Van Dyck and Baguette, 2005).

3.1. Les différents types de dispersion chez les insectes

De manière générale la dispersion désigne tous les processus par lesquels des êtres vivants, se séparant — ou étant séparés — géographiquement d'une population d'origine, colonisent (ou recolonisent) un nouveau territoire (Begon et al., 2009). La dispersion est connue pour être un processus clef en écologie, évolution et biologie de la conservation (Bullock et al., 2002; Clobert et al., 2001). Pour l'ensemble des insectes ailés la dispersion se fait grâce au vol (Johnson, 1969). Cependant, le vol est une activité qui peut également servir pour d'autres processus biologiques comme la recherche de ressources alimentaires ou de

refuges. Comme ces processus n'ont pas lieu à la même échelle spatiale, les comportements de vol qui leur sont associés peuvent être différents. Les types de déplacement nécessaires à la recherche alimentaire, à une échelle locale, ne sont en effet pas les mêmes que ceux nécessaires à une migration à une échelle régionale ou continentale (Ims, 1995). D'après (Van Dyck and Baguette, 2005), la dispersion peut être réalisée à l'aide de deux types de mouvements. Premièrement, elle peut résulter d'une activité journalière de recherche de ressources faite par des mouvements de routine comme la recherche alimentaire, de sites de ponte ou de refuges. Deuxièmement, la dispersion peut-être réalisée par des mouvements plus occasionnels et prévus pour des déplacements à plus grande échelle loin du site d'origine des individus comme les migrations. Les migrations correspondent à un déplacement de masse souvent direct sur de grandes distance, d'un grand nombre d'individus d'un endroit à un autre (Begon et al., 2009) permettant de coloniser de nouveaux territoires. Pour des taxons présentant un fort polymorphisme de dispersion comme les pucerons avec des formes ailées et aptères (Zera and Denno, 1997) les mouvements de grands déplacements sont d'un point de vue comportemental clairement différents des mouvements de routine. En effet, des variations morphologiques évidentes nous renseignent sur la capacité des individus à se disperser et il est ainsi possible de comparer les nombres d'individus "dispersants" entre différentes populations et entre différents paysages (Denno et al., 2001). Cependant, la plupart des insectes comme les *Monochamus* ne présentent pas ce polymorphisme et semblent n'utiliser qu'un seul type de locomotion pour l'ensemble des activités nécessitant la dispersion. L'absence de différences morphologiques (Hanski et al., 2002) et l'utilisation du même mode de déplacement pour plusieurs fonctions écologiques rend donc difficile l'interprétation de ces mouvements en terme de dispersion puisque les différences entre populations ou habitats peuvent être dus à des facteurs indépendants de la dispersion (Van Dyck and Matthysen, 1999). L'étude réalisée par Baars (1979) fut une des premières à mettre en évidence la capacité des animaux à alterner entre des mouvements exploratoires à échelles locale et des mouvements directs à plus vaste échelle. Dans un contexte d'habitats fragmentés, en utilisant des carabes comme modèle, elle a ainsi montré que les mouvements directs et rapides apparaissaient souvent entre fragments tandis que des mouvements exploratoires plus lents étaient plus fréquents au sein des fragments. Par la suite, d'autres travaux portant sur des insectes ont confirmé que même des espèces de papillons connues comme sédentaires pouvaient présenter ces mouvements directs et rapides permettant de s'adapter à la fragmentation de leur habitat (Kuras et al., 2003; Maes et al., 2004).

En ce qui concerne *M. galloprovincialis*, cette espèce ne présente pas de comportement de migration au sens strict (Akbulut and Stamps, 2012). Il nous faut donc présumer que sa dispersion résulte principalement de mouvements de routine et occasionnellement de mouvements directs plus importants.

3.2. Le cout énergétique du vol et le compromis entre dispersion et reproduction

Les *Monochamus* sont des insectes qui se déplacent principalement par le vol, type de comportement connu pour être un des plus coûteux d'un point de vue énergétique dans le règne animal (Candy et al., 1997). En effet, les taux métaboliques chez les insectes en vol sont 50 à 100 fois plus importants que lorsqu'ils sont au repos (Beenackers et al., 1984). Le vol nécessite donc la synthèse et le stockage de grandes quantités d'énergie qui peuvent se présenter sous la forme de sucres solubles, de glycogène ou de lipides ou sous la forme d'une combinaison de ces différents éléments notamment pour les vols longue distance comme lors des migrations (Chapman et al., 2013). Chez les insectes dont le vol est le principal moyen de déplacement se mettent alors en place des compromis pour l'allocation de l'énergie entre la dispersion et d'autres fonctions avec des coûts énergétiques importants comme la reproduction (Walters and Dixon, 1983; Zera and Harshman, 2001). En effet, le développement musculaire ainsi que la production de "carburant" nécessaire au vol sont souvent en compétition avec le développement ovarien et la production d'œufs pour l'utilisation de l'énergie disponible (Rankin and Burchsted, 1992; Ronce, 2007). La répartition de la quantité d'énergie disponible entre dispersion et reproduction est souvent contrôlée génétiquement (Gu et al., 2006; Yukilevich, 2005). Cette quantité d'énergie disponible quant à elle est conditionnée par l'acquisition de nutriments pendant les stades larvaires et/ou la phase adulte de la vie des insectes (Boggs and Ross, 1993; Coll and Yuval, 2004). Un grand nombre d'études réalisées sur des insectes présentant un polymorphisme alaire a mis en évidence des compromis d'allocation clairement différentes entre les formes ailées et aptères (Mole and Zera, 1993; Roff, 1990). Les formes aptères investissent principalement dans la reproduction puisqu'elles n'ont aucun coût associé au vol. Les formes ailées, elles, ne peuvent investir dans la reproduction que lorsque la quantité de nutriments disponibles est suffisante pour leur permettre d'allouer de l'énergie aux deux fonctions, dispersion et reproduction (Mole and Zera, 1994). Cependant, pour les insectes non-

dimorphiques, ces compromis semblent dictés par des stratégies d'acquisition et d'allocation plus complexes (Boggs, 2009).

3.3. Les stratégies d'allocation d'énergie entre dispersion et reproduction

L'acquisition de nutriments et leur allocation dans divers processus physiologiques est une question centrale en écologie (Boggs, 1992; Van Noordwijk and de Jong, 1986). Historiquement, ces processus ont principalement été utilisés pour étudier l'investissement dans la reproduction avec les concepts de « capital breeder » et « income breeder » (Casas et al., 2005; Jervis et al., 2008; Wessels et al., 2010). Les insectes holométaboles, comme les *Monochamus*, sont caractérisés par deux phases et modes de vie très distincts et déterminants dans leur gestion de l'énergie : les stades larvaires et le stade adulte (Boggs, 2003). Au stade adulte, les ressources allouées à la reproduction peuvent provenir des réserves stockées ou de l'alimentation courante (Boggs, 1997a, 1997b; Fischer et al., 2004; Wheeler, 1996). Les réserves stockées sont généralement issues des stades larvaires et les ressources courantes, venant du stade adulte (Fischer et al., 2004), sont acquises via une recherche alimentaire en continu (Boggs, 1992). L'allocation de ressources peut donc être vue comme l'investissement de ressources accumulées et stockées pendant les stades larvaires ou comme l'investissement de ressources acquises pendant la vie adulte et consommées presque instantanément (Boggs, 2009).

Encart 1 : Cadre conceptuel de l'allocation d'énergie (Boggs, 2009).

Les nutriments sont acquis par un organisme à différents stades de son développement. Ils sont ensuite métabolisés puis alloués en fonction de l'âge et du sexe des individus à différents compartiments : reproduction, maintenance, recherche de ressources, croissance, stockage produisant ainsi l'ensemble des traits d'histoire de vie observable. Pour les insectes holométaboles qui ont une histoire de vie complexe, l'allocation est un processus en trois étapes : ❶ durant les stades larvaires, les nutriments provenant de la mère ou acquis pendant ces stades sont alloués à la croissance, à la maintenance, à la recherche de nouvelles ressources ou stockés. ❷ Durant le stade nymphe, une partie des ressources précédemment stockées sont réallouées à la « construction » du corps adulte, à la maintenance, et à la mise en place des organes reproducteurs. ❸ Au cours de la vie adulte, les ressources nouvellement acquises ainsi que celles stockées pendant les stades larvaires sont allouées aux différents traits de vie et aux activités de recherche alimentaire. L'allocation n'est jamais efficace à 100% et à toutes ces étapes, une partie des ressources est également perdue.

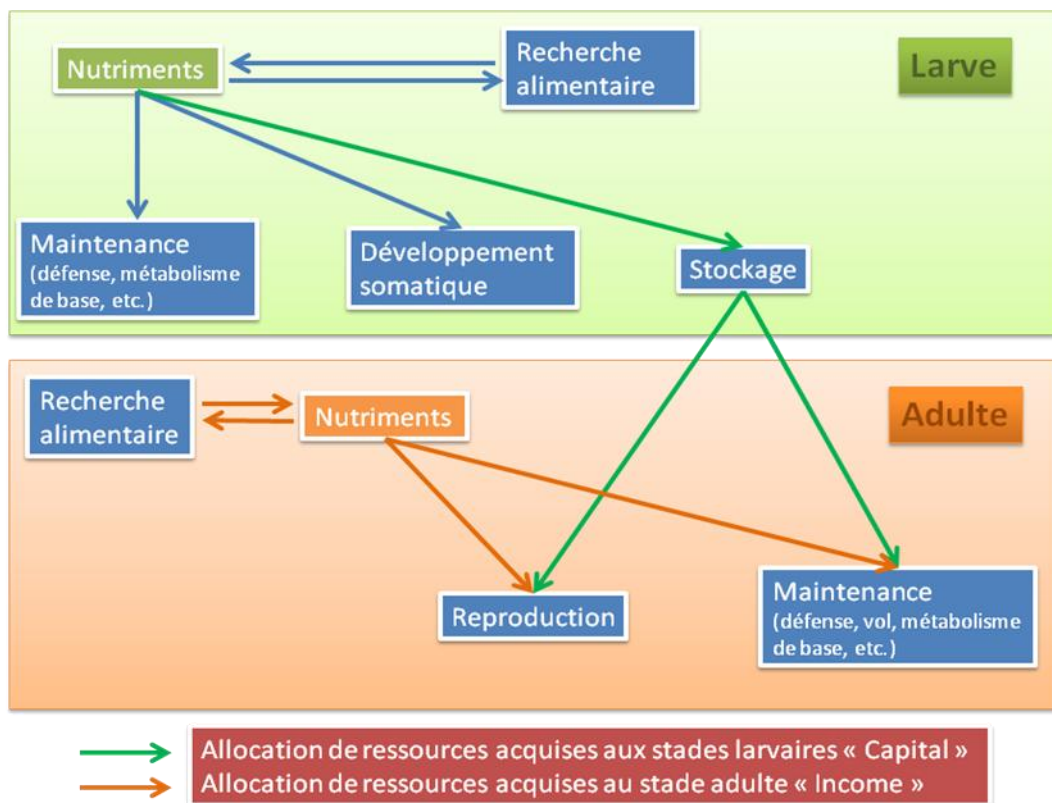


Figure 8 Schéma des stratégies d'allocation d'énergie d'après Boggs (2009)

Les espèces « capital breeder » sont souvent pré-ovogéniques (Jervis et al., 2005), c'est à dire qu'elles présentent une importante charge en œufs dès leur émergence. Cela pourrait limiter leurs capacités de dispersion avant la période de ponte à cause d'une allocation préférentielle de l'énergie disponible pour la reproduction au détriment de la dispersion (Dixon et al., 1993; Jervis et al., 2005; Tammaru and Haukioja, 1996). Ces espèces pré-ovogéniques présenteraient également une plasticité moindre face à la variation de la qualité de l'environnement (Ellers and Jervis, 2004). En effet, comme ces espèces possèdent à l'émergence la totalité de leur stock d'œufs pour l'ensemble de leur durée de vie, elles ne peuvent pas l'augmenter, même s'il existe davantage d'opportunités de ponte. Cette stratégie semble donc surtout performante si les conditions environnementales sont peu variables et si les sites de pontes sont abondants et à faible distance du lieu d'émergence.

Au contraire, les espèces « income breeder » allouent à la reproduction de l'énergie acquise lors de l'alimentation au stade adulte. Elles sont donc synovogéniques : elles ne présentent aucun œuf à leur émergence (Jervis et al., 2001). Cela peut leur permettre d'avoir une mobilité accrue à l'émergence (Jervis et al., 2005), en accord avec la théorie « oogenesis-flight syndrome » (Lorenz, 2007; Zera, 2005), puisque l'énergie non investie dans la reproduction peut être allouée au vol et donc à la dispersion. De plus, une telle stratégie permet une meilleure flexibilité vis-à-vis des conditions changeantes de l'environnement (Jervis et al., 2003). Elle permet aux femelles d'optimiser leur fécondité en l'ajustant à la disponibilité en sites de pontes (Jervis et al., 2003; Jervis and Ferns, 2004). Par exemple chez certaines espèces synovogéniques comme le parasitoïde *Eupelmus vuilleti*, le taux de maturation des œufs peut être induit par la rencontre d'hôtes (Casas et al., 2009). Une telle capacité d'adaptation peut être encore augmentée par le phénomène de résorption d'œufs qui confère aux femelles la capacité de réallouer l'énergie de la reproduction vers la maintenance si les conditions leur sont défavorables (Richard and Casas, 2009). Cependant en l'absence totale de nourriture à l'émergence ces espèces sont dans l'incapacité de produire des œufs et donc de se reproduire.

La plupart de ces stratégies ont été décrites chez des parasitoïdes mais il semble probable que les espèces d'insectes longue durée de vie comme les *Monochamus* soient plutôt synovogéniques et aient la possibilité d'investir à la fois des ressources acquises au stade larvaire et durant la vie adulte aux fonctions de reproduction (Jervis et al., 2008, 2007). En effet, les espèces longévives ont tendance à investir plus de ressources dans la construction

d'un corps robuste pendant la métamorphose en comparaison des espèces vivant moins longtemps (Jervis et al., 2008). Cette stratégie leur permet d'avoir à l'émergence une capacité de recherche alimentaire opérationnelle leur permettant ensuite d'ajuster leur investissement dans la reproduction en fonction de l'hétérogénéité de leur habitat. Nous avons donc émis l'hypothèse que les *Monochamus* sont des insectes « income breeder » et synovigéniques. En effet, ils vivent dans un milieu où les ressources alimentaires pour les adultes émergents (jeunes pousses de pins) sont généralement très abondantes tandis que leurs sites de ponte (bois morts) sont beaucoup plus rares et donc plus dispersés dans l'environnement. Il s'en suit que ces insectes investiraient l'énergie accumulée aux stades larvaires dans un corps robuste permettant une meilleure maintenance et une capacité de prospection importante pour pouvoir ensuite investir l'énergie acquise pendant leur vie adulte dans la reproduction.

4. Problématiques de la thèse

L'objectif premier de ce travail était donc de fournir des informations concernant les capacités de dispersion de *M. galloprovincialis*, principal insecte vecteur européen du nématode du pin, dans le but de mettre au point un modèle de dispersion de la maladie le plus précis possible. Nous nous sommes alors concentrés sur les étapes clefs de la dispersion de cet insecte.

Tout d'abord, nous avons étudié la période de maturation de l'insecte puisque c'est pendant cette période qu'a lieu la principale phase d'inoculation des nématodes. Le premier chapitre de cette thèse porte donc sur la mise en place des capacités de vol chez les jeunes adultes et sur leurs compromis d'allocation d'énergie entre dispersion et reproduction. Nous avons ici fait l'hypothèse que comme *M. galloprovincialis* est un insecte longévif, il devait être synovogénique (Jervis et al., 2008) et investir dans la dispersion la majorité des ressources acquises lors des stades larvaires tandis que l'investissement dans la reproduction pourrait surtout dépendre des ressources acquises lors de la vie adulte.

Ensuite, nous nous sommes concentrés sur le maintien de cette capacité de vol au cours de la vie des *M. galloprovincialis* adultes. Le deuxième chapitre du manuscrit de thèse est donc consacré à l'étude de l'effet de l'âge sur les capacités de dispersion de *M. galloprovincialis*. Dans cette partie, nous avons fait l'hypothèse que la dispersion de cet insecte était principalement due à des mouvements de routine, avec une faible proportion de déplacements à très longues distances. La capacité de dispersion de ces insectes étant principalement due à une activité de recherche alimentaire, nous avons également émis l'hypothèse que cette capacité ne devait pas ou peu se dégrader au cours du temps.

Ces insectes sont apparus comme pouvant voler toute leur vie et donc potentiellement inoculer le nématode pendant de longues périodes. Étant donné qu'un des facteurs les plus importants pour l'expansion des espèces invasives est le changement climatique (Parmesan and Yohe, 2003), nous avons focalisé le troisième chapitre sur l'étude des effets de la température sur la longévité de ces insectes. Nous avons ici émis l'hypothèse d'une augmentation des performances des individus avec l'augmentation des températures moyennes mais limitée par une augmentation de la variabilité des températures (Vasseur et al., 2014).

Le manuscrit est complété par un chapitre présentant les conclusions générales de l'étude, les implications pratiques et des perspectives de recherche.

Chapitre II

Mise en place des capacités de vol : implication pour l'allocation de l'énergie entre dispersion et reproduction pendant la phase de maturation

Titre : Resource allocation during the maturation of a long-lived insect: implications for dispersal and reproduction. G. David, B. Giffard, I. van Halder, D. Piou, H. Jactel. Article soumis à *Basic and Applied Ecology*.

Objectif : Etudier la mise en place des capacités de vol chez *M. galloprovincialis* ainsi que les possibles compromis d'allocation d'énergie entre dispersion et reproduction

Résumé : Les stratégies d'allocation de l'énergie ont été largement documentées chez les insectes et ont été formalisées dans le cadre de la reproduction par les concepts de « capital breeders » et « income breeders ». Nous proposons ici d'étendre ce cadre théorique à la capacité de dispersion, avec les concepts de « capital dispersers » et « income dispersers », et d'explorer les possibles compromis d'allocation de ressources entre dispersion et reproduction chez un insecte longévif. Pour cette étude, nous avons choisi *M. galloprovincialis* car il est le principal vecteur du nématode du pin en Europe.

Nous avons supposé que les capacités de vol augmentaient avec l'âge de l'insecte, en raison de l'accumulation de « carburant » lors des repas de maturation. Nous avons également émis l'hypothèse que cette capacité était dépendante du sexe, en raison de la concurrence pour l'utilisation des ressources énergétiques entre la constitution de l'appareil de vol et la production d'œufs chez les femelles.

Nous avons estimé la capacité de vol à l'aide d'un manège de vol et utilisé le nombre d'œufs matures comme un proxy pour l'investissement dans la reproduction. Enfin, nous avons utilisé le rapport entre le poids sec du thorax et de l'abdomen comme un proxy pour le compromis d'allocation.

Nous avons montré que la probabilité de vol ne dépend pas de l'âge ou du sexe des insectes. La distance de vol semble augmenter avec l'âge chez les individus des deux sexes. Elle a également été positivement associée à la quantité de réserves dans le thorax chez le mâle et la femelle. Chez les femelles, le poids de l'abdomen et le nombre d'œufs ont également augmenté en fonction de l'âge. Nous concluons donc que ce coléoptère longévif est à la fois un « income breeder » et « capital disperser », ce qui a des implications importantes pour la gestion de ses populations.

1. Abstract

Energy allocation strategies have been widely documented in insects and were formalized in the context of the reproduction process by the terms “capital breeders” and “income breeders”. We propose here the extension of this framework to dispersal ability, with the concepts of “capital dispersers” and “income dispersers”, and the use of a long-lived insect to explore the trade-off in resource allocation between dispersal and reproduction. We used *Monochamus galloprovincialis* as model organism for this study, because it is the main vector of the pine wood nematode which has important economic impact. We hypothesised that the flight capacity increases with age, due to fuel accumulation, and that flight capacity is sex-dependent, due to competition for energy resources between the flight apparatus and egg production in females. We estimated the flight capacity with a flight mill and used the number of mature eggs as a proxy for the investment in reproduction. We used the ratio between the dry weights of the thorax and abdomen as a proxy for the trade-off. Probability of flying was not dependent on insect age or sex. Flight distance increased with age in individuals of both sexes. It was also positively associated with energy allocation to thorax reserves in both males and females, which increased as a function of age. In females, abdomen weight and the number of eggs also increased as a function of age. We therefore conclude that this long-lived beetle is both an "income breeder" and a "capital disperser," which has important implications for the management of its populations.

Key-words:

allocation strategy, flight capacity, *Monochamus galloprovincialis*, trade-off

2. Introduction

Dispersal and reproduction are critical processes for population maintenance and evolution. Dispersal behaviour is defined as the spread of individuals away from others (Begon et al., 2009) and, for most insects, dispersal involves flight (Johnson, 1969). Dispersal may occur at different spatial scales, from searching for food in a local patch to migratory movements at the regional or continental scale (Ims, 1995). Insect flight is known to be the most costly type of behaviour, in terms of energy consumption, in the animal kingdom (Candy et al., 1997). The metabolic rates of flying insects can be 50–100 times higher than those of resting animals (Beenakkers et al., 1984). Flight requires the prior biosynthesis and storage of large quantities of flight fuel, in the form of blood sugars, glycogen and lipids or a mixture of these compounds for long-distance flight (Chapman et al., 2013). In insects, in which flight is the principal means of dispersal, there is often a trade-off between flight capacities and other energy-expensive vital functions, such as reproduction. The construction of a flight apparatus and the production of flight fuel compete for energy with ovarian development and oogenesis (Rankin and Burchsted, 1992; Ronce, 2007). (Zera and Denno, 1997) showed that the energetic cost of fuel biosynthesis for flight would probably lead to a decrease in the fitness of dispersing individuals. Insect dispersal and reproduction are therefore dependent on the available energy budget, which is genetically controlled (Gu et al., 2006; Yukilevich, 2005) and dependent on the acquisition of nutrients during the larval and/or adult stage (Boggs and Ross, 1993; Coll and Yuval, 2004).

Resource allocation can be seen as the expenditure of capital resources accumulated and stored at earlier life stages or as the expenditure of income resources acquired during the adult stage (Boggs, 2009). (Jervis et al., 2005) proposed two extreme strategies linking allocation strategy and ovarian development in holometabolous insects. “Capital breeder” species invest all the energy accumulated during the larval stages in reproduction. Species of this type are pro-ovigenic and the adults contain mature eggs at emergence. By contrast, “income breeder” species acquire the energy for reproduction from feeding during the adult stage. The adults have no mature eggs at emergence and are synovigenic.

However, many insects, especially long-lived species, have the potential to allocate both larval-derived capital and adult-acquired income resources to reproductive function (Jervis et al., 2008, 2007). Long-lived species usually invest more energy resources into building a

robust body during metamorphosis, whereas short-lived species invest more in egg production. In many insects, investment in the thoracic musculature and wings (which control aerial dispersal capability) is thought to occur at the expense of investment in reproductive tissues and eggs, or vice versa, in accordance with the oogenesis-flight syndrome theory (Dixon et al., 1993). This trade-off between dispersal and reproduction has been studied mostly in dimorphic insect species, such as crickets like *Gryllus firmus* and several aphid species (Guerra, 2011; Mole and Zera, 1994). Only a few studies have focused on non-dimorphic insects, such as *Cydiapomonella* (Lepidoptera) (Gu et al., 2006) or *Chrysoperlasinica* (Neuroptera) (Khuhro et al., 2014) and mainly at the reproductive side of the trade-off. We proposed here to extend the conceptual framework of “capital” versus “income” life-history strategies to dispersal with the concepts of “capital dispersers” and “income dispersers”. Being “capital disperser” might allow beetles to deal with a rare and scattered feeding resource while being “income dispersers” would need to have them close to the emergence site. We were also interested in tackling the trade-off issue between energy allocation to dispersal and reproduction. According to (Glazier, 1999) favourable conditions may allow animals to invest energy in several traits resulting in an apparent absence of trade-off but this has been rarely tested in insects.

This study focused on *Monochamus galloprovincialis* Olivier (Coleoptera: Cerambycidae) which is a long-lived beetle, with a generation time of 236 ± 47 days and adult longevity of 63 ± 6 days (Akbulut et al., 2008; P. Naves et al., 2006). This beetle is a source of growing concern because of its role as the main vector of the pine wood nematode (PWN) since its introduction into Europe (Sousa et al., 2001). The PWN, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner and Buher) Nickle is responsible for pine wilt disease (PWD), which constitutes the principal threat to pine forests in southern Europe. The spread of PWN depends principally on the dispersal ability of its insect vector (David et al., 2014). Beetles of the genus *Monochamus* need dead or decaying pines for larval development (P. M. Naves et al., 2006). This resource is often rare and scattered across the forest landscape, unlike the healthy trees required for maturation feeding. Indeed, after emergence, adult *M. galloprovincialis* beetles spend about three weeks feeding on fresh pine shoots, during which time they mature and begin inoculating healthy trees with nematodes (Evans et al., 1996; Naves et al., 2007). It is therefore of great importance to know more about the establishment of flight capacity and possible trade-offs between flight capacity and investment in reproduction. Such knowledge

would make it possible to estimate the amounts of energy allocated to the dispersal of the insect vector and, thus to improve predictions of the spread of PWN disease.

In this study, we hypothesised that because *M. galloprovincialis* long-lived, females should be synovigenic (Jervis et al., 2008) and use capital resources to invest in flight musculature while adult income resources would fuel oogenesis. By contrast, males were expected to invest primarily in dispersal as less energy is required for their reproductive maturation than for females. Fuel demands are indeed much greater for oogenesis than for spermatogenesis in insects (Fadamiro et al., 2005). So we predicted that (1) the flight capacity of *M. galloprovincialis* increases with the ageing of beetles, during the maturation period, due to the accumulation of flight fuel, and that (2) flight capacity is sex-dependent, due to competition for fuel allocation between reproduction and flight capacity in females. We estimated the flight capacity of beetles with a flight mill apparatus and used the number of mature eggs as a proxy for the investment of the females in reproduction. We used the ratio between the dry weights of the thorax and abdomen to estimate the trade-off in energy allocation between dispersal and reproduction.

3. Materials and Methods

3.1. *Insect material*

Adult beetles were obtained from fresh deadwood from maritime pine *Pinus pinaster* Aiton, collected from three pine stands located close together in Cestas, France (44° 44' 43" N; 0° 40' 52" W), in January and February 2012. Logs were stored in a climatic chamber until the beetles emerged (temperature $21 \pm 1^\circ\text{C}$ and L:D 16h:8h). Newly emerged adult insects were collected daily, marked individually with white spots on the elytra, and weighed to the nearest 1 μg with a precision balance (Mettler Toledo, Semi-Micro MS205DU). This first weight was defined as the weight at emergence (W_0). We recorded the sex of each beetle and the length of its right elytron. Beetles were reared in plastic boxes ($35 \times 45 \times 24$ cm), with a maximum of 10 beetles per box. All the beetles in a given box were of the same sex. Boxes were stored in a climatic chamber, under the same controlled conditions as for the pine logs. The beetles were supplied *ad libitum* with fresh maritime pine shoots until testing. In total, we used 49 males and 49 females of *M. galloprovincialis* in the experiment. For studies of the effect of maturation, we used 10 males and 10 females of each age (0, 5, 10, 20 and 30

days old), except for males of 0 days and females of 10 days of age, for which we only used 9 individuals.

3.2. *Flight mill recordings*

The flight mill design was adapted from that described by (Atkins, 1961; Jactel and Gaillard, 1991)(see (David et al., 2014) for a detailed description). Flight was initiated by a gentle air flow in front of the beetle's head. Each beetle was tested for 10 minutes. Beetles were considered to be "fliers" if they were able to complete at least one individual flight lasting more than 30s. For each insect, we analysed flight performance as the probability of flying and the total distance flown during the 10-minute test. All insects were weighed before the flight recording, and the value obtained was considered to be the weight at age t (Wt). After the test, the insects were frozen at -20 °C until the biochemical analyses.

3.3. *Energy reserves and muscle extractions*

All the beetles tested were separated into four parts: the pterothorax, the abdomen, the eggs and the remaining parts (*i.e.* head, pronotum, legs and wings). We counted the total number of mature eggs in the abdomen of each female. All body parts were then dried individually in a desiccator for 24 h at 60 °C and their dry weight was measured with a precision balance (accuracy: $\pm 1 \mu\text{g}$). For the quantification of lipid and free carbohydrate reserves, we then immersed the pterothorax in 2 ml of petroleum ether for 48h at 40 °C. This body part was then desiccated again for 24 h at 60°C and reweighed (Ellers and Van Alphen, 1997). The difference between the first and second dry weight values was considered to represent the energy reserve content. Finally, for the quantification of flight muscles, the pterothorax was immersed in 2ml of 10 % KOH solution for 24 h at 40 °C, redesiccated and reweighed (Fischer and Kutsch, 2000). The difference between the thorax dry weight after reserve extraction and the final dry weight was considered to represent the weight of the flight muscles.

3.4. Statistical analyses

Effect of ageing on flight performances and resource allocation

The fresh weight of the beetle at emergence $W0$ and its size (elytron length) were highly correlated ($r = 0.91$, $P < 0.001$) and could not, therefore, be used as independent variables in the same model. We used only body weight in subsequent analyses, because this approach was more consistent with our hypothesis of weight gain during the maturation period.

We assessed the effects of weight at emergence ($W0$), sex and age on flight performances, i.e., the probability of flying and the distance flown. The probability of flying was assessed with a generalised linear model (GLM), using a binomial family with a logit link. The distance flown was tested only for “fliers”, with a linear model.

We tested the effects of $W0$ and age on the number of mature eggs for females, using a quasi-Poisson GLM with a log link (count data with overdispersion).

We analysed the effect of ageing during maturation on resource allocation, by using linear models to assess the effects of age and sex on the weight of the total insect at age t (Wt), on the dry weight of thorax (Wth) and on the dry weight of abdomen (Wab).

We explored the effect of ageing during maturation on the energy allocation trade-off between dispersal (building of the flight apparatus) and reproduction, using the ratio between the dry weights of the thorax and abdomen (Wth/Wab). We used linear models to assess the effects of age and sex on this ratio. In all models, we used the weight at emergence ($W0$) as covariable to take into account differences in beetle size (Raubenheimer, 1995). The inclusion of log-transformed age improved AIC values in all models. We therefore included a log-transformed age variable in all subsequent statistical analyses.

Effect of weight allocation on dispersal capacities

We investigated the effect of relative thorax weight ($rWth$), proportion of muscles in the thorax ($\%th_{mus}$), proportion of reserves in the thorax ($\%th_{res}$) and relative abdomen weight ($rWab$) on the distance flown.

$$rWth = Wth/W0 \quad (1)$$

$$rWab = Wab/W0 \quad (2)$$

$$\%th_{mus} = Wth_{mus}/Wth \quad (3)$$

$$\%th_{res} = Wth_{res}/Wth \quad (4)$$

With Wth_{mus} and Wth_{res} the dry weight of muscles and energy reserves in the thorax. We used relative weights (i.e. dividing by total weight at emergence) rather than absolute weights, to take into account differences in beetle size.

Each of the four explanatory variables was tested in separate linear models, together with their interactions with sex factor. All the models were simplified, by the removal of non-significant interaction terms. The significance of each effect term was assessed by comparing the deviances of models fitted with and without each effect term, by F-tests for linear models or χ^2 tests for binomial and quasi-poisson GLM (Crawley, 2012). For each model, we checked that the residuals complied with the assumptions of normality and homoscedasticity. All statistical analyses were carried out in the R statistical environment (R development core team., 2013).

4. Results

4.1. *Effect of ageing on flight performances and energy resource allocation*

Overall, 45% (44 of 98 insects) of the beetles were classified as fliers. The probability of flying increased significantly with weight at emergence but was not affected by sex or age (Table1). The distance flown on the flight mill increased significantly with age (Fig. 1), but not with weight at emergence. There was no difference in distance flown between the sexes (Table 1).

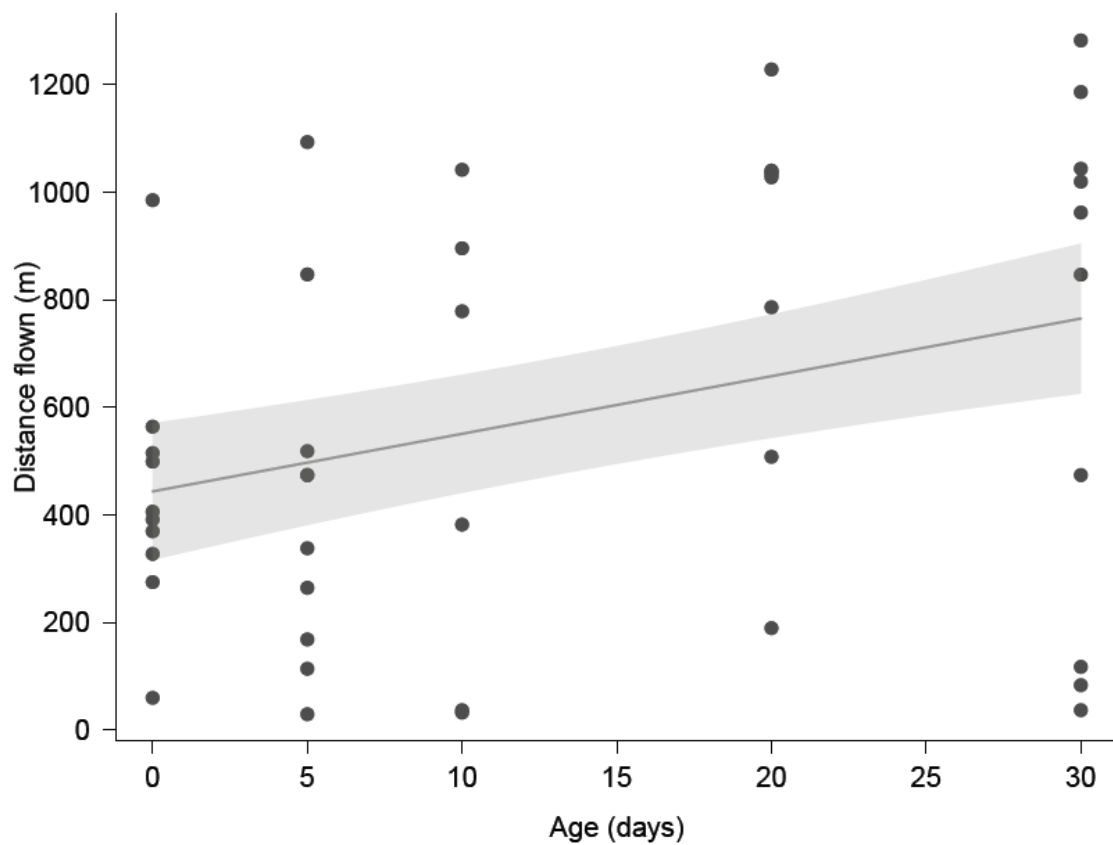


Fig.1 Effect of beetle age on distance flown per session by *M. galloprovincialis*. The line corresponds to the model prediction, and the shaded area to the standard error. Distance flown (m) = $10.71 \times \text{Age (days)} + 443$

Table 1 Summary of results for linear and generalized linear models assessing the effects of weight at emergence (W0), sex and age on flight parameters, weights and number of eggs.

Response variables	Fixed effects	df	χ^2 or F values *
Probability of flying ($n=98$)	Weight at emergence	1	10.55 **
	Sex	1	0.91
	Age	1	0.32
Distance flown ($n=44$)	Weight at emergence	1,40	1.03
	Sex	1,40	0.93
	Age	1,40	4.54 *
Total weight of insect ($n=98$)	Weight at emergence	1,94	986.17 ***
	Sex	1,94	3.21
	Log(Age+1)	1,94	51.88 ***
Dry weight of thorax ($n=98$)	Weight at emergence	1,94	868.55 ***
	Sex	1,94	0.04
	Log(Age+1)	1,94	100.59 ***
Dry weight of abdomen ($n=98$)	Weight at emergence	1,93	180.49 ***
	Sex	1,93	43.42 ***
	Log(Age+1)	1,93	76.15 ***
Ratio weight of thorax / abdomen ($n=98$)	Sex \times Log(Age+1)	1,93	9.26 **
	Weight at emergence	1,93	0.19
	Sex	1,93	124.60***
Number of eggs ($n=49$)	Log(Age+1)	1,93	78.31 ***
	Sex \times Log(Age+1)	1,93	9.90 **
	Weight at emergence	1,47	17.32 ***
	Age	1,47	41.65 ***

Significant P values are indicated in bold characters (*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$).
 * χ^2 for tests on the probability of flying, F values for all other variables

After removing the effect of weight at emergence, beetles' weight significantly increased with age, with a rapid initial gain followed by a levelling out (Table 1, Fig.2). The sex of the insect had no effect on weight gain (Table 1).

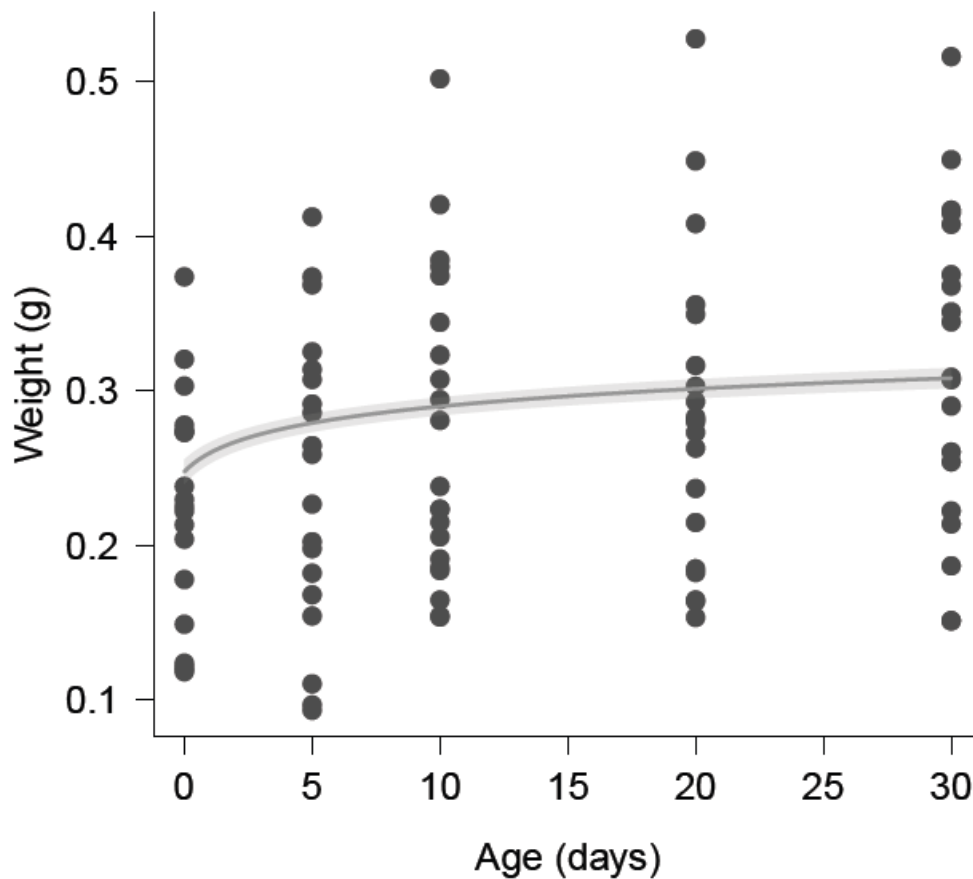


Fig.2 Effect of beetle age on body weight of *M. galloprovincialis*. The line corresponds to the model prediction, and the shaded area to the standard error. $\text{Weight} = 2 \times 10^{-2} \times \text{Log}(\text{Age}+1) + 2 \times 10^{-1}$

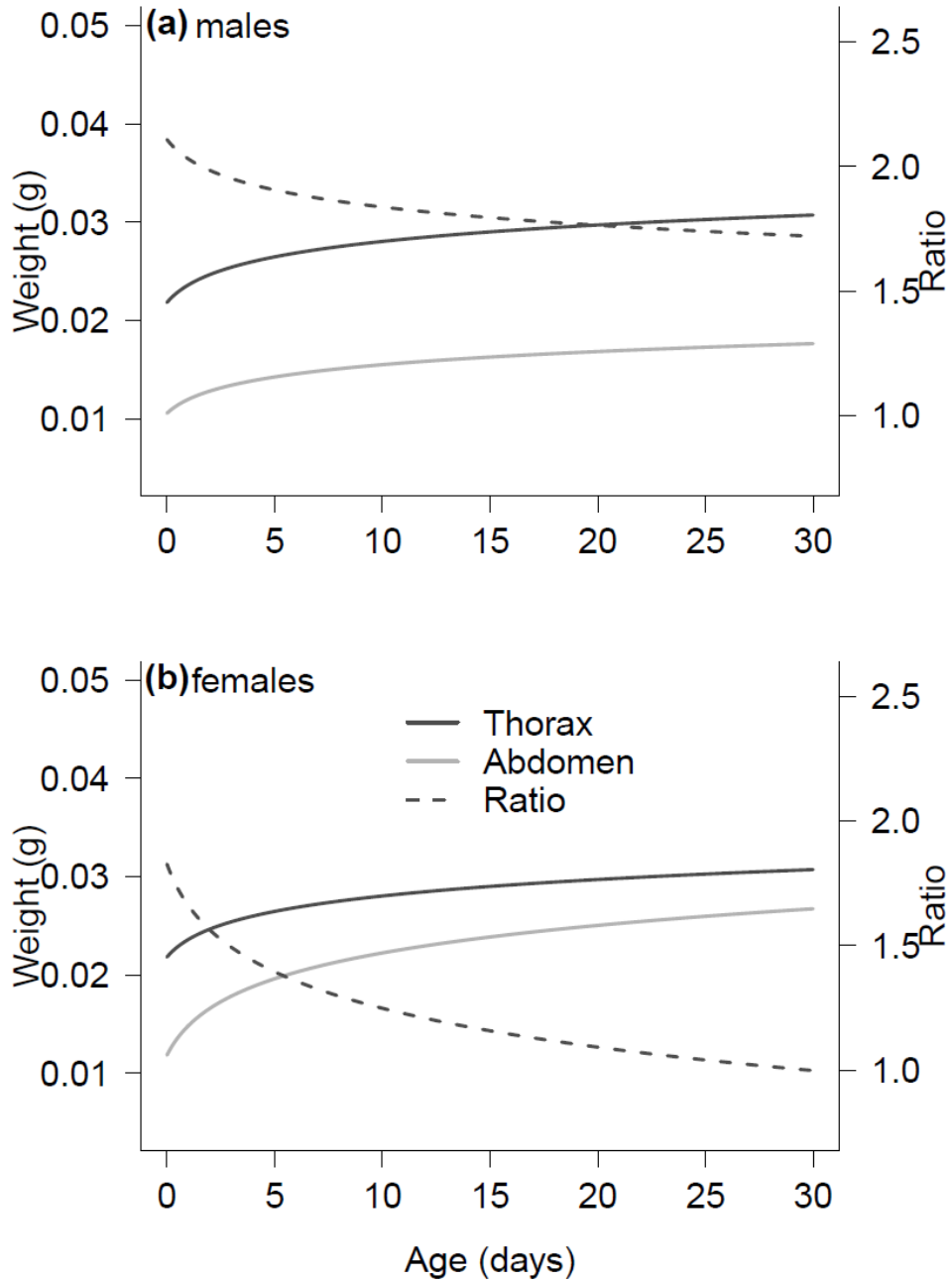


Fig.3 Effect of beetle age on thorax weight W_{th} (black lines), abdomen weight W_{ab} (grey lines) and their ratio, W_{th}/W_{ab} (dash line) in *M. galloprovincialis*. a) males, [$W_{th} = 1 \times 10^{-2} \times \text{Log}(\text{Age}+1) + 2 \times 10^{-2}$; $W_{ab} = 1 \times 10^{-2} \times \text{Log}(\text{Age}+1) + 1 \times 10^{-2}$; Ratio = $-0.1 \times \text{Log}(\text{Age}+1) + 2$] and b) females, [$W_{th} = 1 \times 10^{-2} \times \text{Log}(\text{Age}+1) + 2 \times 10^{-2}$; $W_{ab} = 2 \times 10^{-2} \times \text{Log}(\text{Age}+1) + 1 \times 10^{-2}$; Ratio = $-0.2 \times \text{Log}(\text{Age}+1) + 2$]

Thorax weight also increased with age, in a similar manner for both sexes (Table 1, Fig. 3). By contrast, females gained significantly more abdominal weight with age than did males (Table 1, Fig. 3, respectively: $t_{df=93} = 8.28$; $P < 0.001$ and $t_{df=93} = 3.95$; $P < 0.001$). The ratio of thorax and abdomen dry weights decreased significantly with age for both males and females, but significantly more so for females (respectively, $t_{df=93} = -3.96$; $P < 0.001$ and $t_{df=93} = -8.44$; $P < 0.001$, Table 1, Fig. 3).

In the first 10 days after emergence, the females contained almost no eggs (Fig. 4). The number of eggs then increased exponentially with age, and was not dependent on weight at emergence (Table 1, Fig. 4).

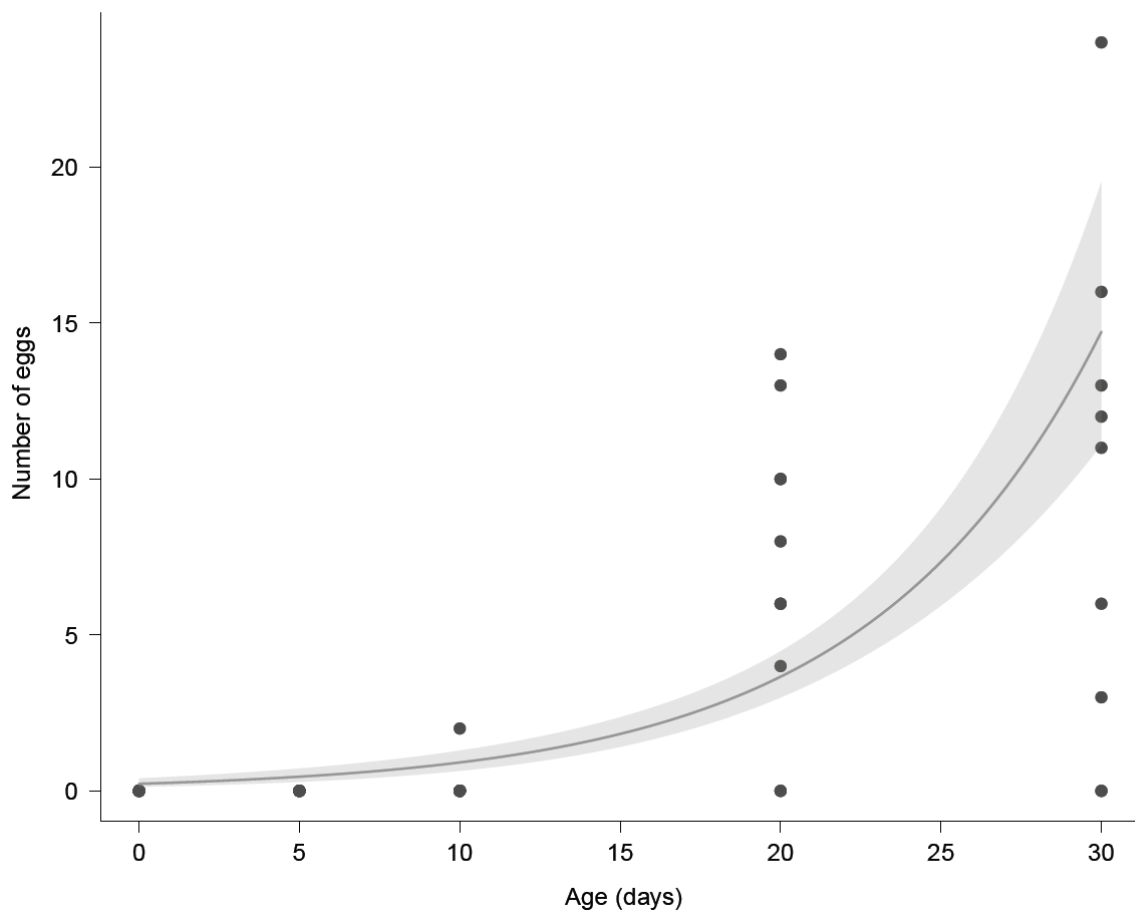


Fig.4 Effect of age on the number of eggs per female. The line corresponds to the model prediction, and the shaded area to the standard error. Number of eggs = $e^{(0.12 \times \text{Age} - 1.7)}$

4.2. Effect of energy allocation on dispersal capacities

Relative thorax weight had a significant positive effect on the distance flown by *M. galloprovincialis*, whereas relative abdomen weight did not (Table 2). The distance flown on flight mills significantly increased with increases in the proportion of energy reserves in the thorax (Table 2, Fig. 5), but not with muscle proportion. Sex had no effect on distance flown, in any of the models.

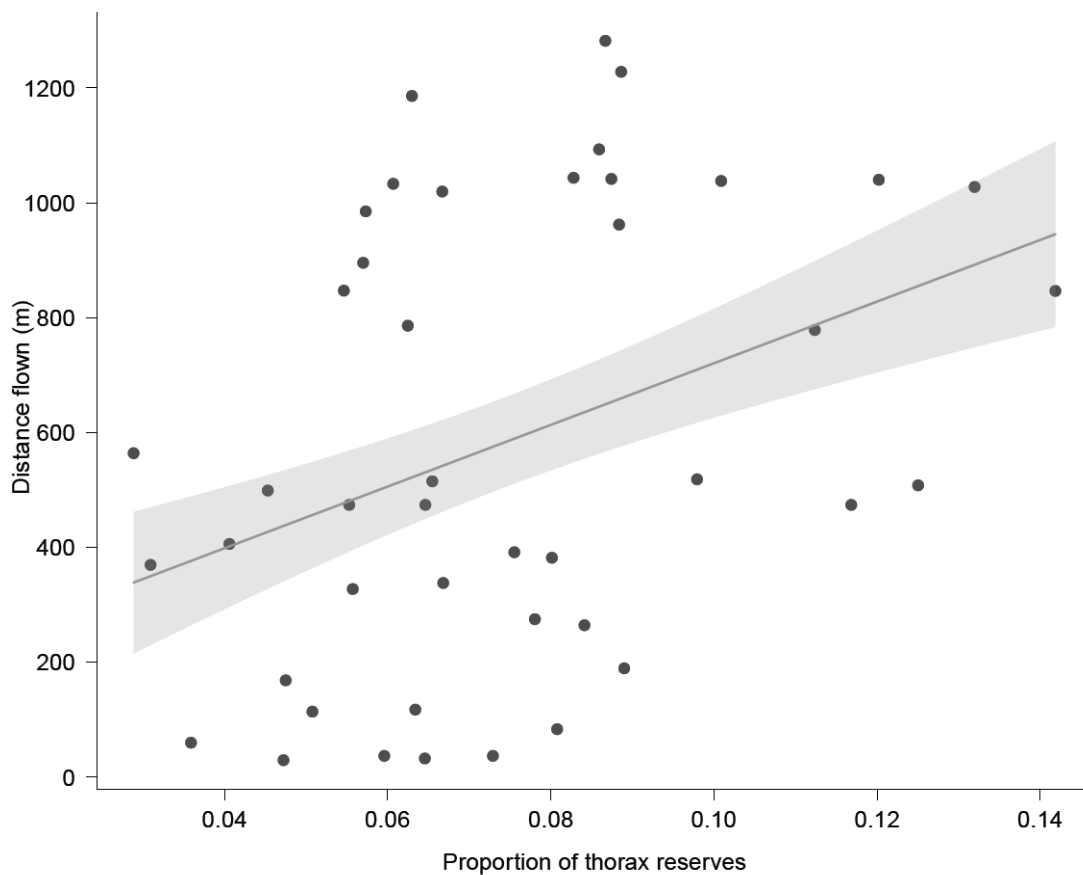


Fig.5 Effect of the proportion of thorax reserves ($\%th_{res}$) on distance flown per session. The line corresponds to the model prediction, and the shaded area to the standard error. Distance flown = $5366.6 \times \%th_{res} + 117.9$

Table 2 Summary of results for linear models assessing the effects of beetles characteristics on distance flown per session. The estimate for sex was calculated with “female” as the reference.

Fixed effects	df	Estimate \pm SE	F values
Relative weight of thorax	1,41	8619 \pm 2835	9.25**
Sex	1,41	79 \pm 110	0.51
Proportion of thorax muscles	1,41	-126 \pm 985	0.02
Sex	1,41	142 \pm 119	1.42
Proportion of thorax reserves	1,41	5367 \pm 2091	6.58*
Sex	1,41	132 \pm 111	1.42
Relative weight of abdomen	1,41	4584 \pm 2659	2.97
Sex	1,41	199 \pm 120	2.77

Significant *P* values are shown in bold characters (****P* < 0.001, ***P* < 0.01, **P* < 0.05).

5. Discussion

We found that almost 50% of immature *M. galloprovincialis* beetles were able to fly and this proportion did not change during the maturation phase (30 days), for either of the sexes. Thus, the flight apparatus was already operational at beetle emergence. However, the probability of flying was dependent on weight at emergence. Flight capacity is therefore developed with capital resources acquired during the larval stages and allocated during metamorphosis. This is consistent with the hypothesis of (Boggs, 1981) that long-lived insects invest in dispersal before reproduction. This ensures that their foraging abilities are good on emergence, allowing them to find new food sources and to sustain fuel accumulation for reproductive functions, such as egg production. Furthermore, good mobility at emergence allows the insect to cope with environmental variability and a lack of predictability concerning the availability of food resources (Jervis et al., 2008).

There was a significant and linear increase in distance flown with age, during maturation. Flight capacity was also positively correlated with the relative weight of thorax. The energy income from adult feeding is probably partly allocated to dispersal (Jervis et al., 2008). The thorax essentially contains only flight muscles and fuel (Chapman et al., 2013), so the

increase in flight capacity associated with an increase in thorax size probably results from a larger musculature and/or the storage of larger amounts of energy to sustain the flying effort (Marden, 2000). In *M. galloprovincialis*, we observed that the proportion of energy reserves in the thorax was significantly correlated with distance flown, whereas no such correlation was observed for the proportion of muscle mass. The accumulation of lipids and carbohydrates in the thorax is, therefore, probably the main driver of improved flight performance during maturation.

Females allocated more weight to the abdomen than males during the maturation period, due to oogenesis. Abdominal weight gain had no effect on flight capacity, indicating that the investment in reproduction in adults is not made at the expense of dispersal capacity. We found no mature eggs in females in their first 10 days, confirming that *M. galloprovincialis* is synovigenic (Jervis et al., 2005). All the energy invested in reproduction came from adult feeding, indicating that these beetles are income breeders (Jervis et al., 2008).

The apparent lack of trade-off between dispersal and reproduction, in terms of energy allocation, seems to be a good strategy for income breeders when food resources are not limited, which is the case for *M. galloprovincialis* feeding on fresh pine shoots during the maturation period. A good flying ability is essential for reproduction because i) virgin females need to disperse to find nutrients and sustain oogenesis (Fischer et al., 2004) ii) males and females must fly to meet and mate, iii) gravid females must fly long distances to find a suitable host (decaying tree) for oviposition (Boggs, 1981).

Our results highlight the importance of maturation feeding for sustaining important dispersal capacities, but not for triggering a process of migration in *M. galloprovincialis*. These findings call into question the relevance of the clear cut zones (500m in radius) recommended for slowing the spread of PWN disease in Europe. Indeed, cutting the forest around infested trees will not prevent the beetles from flying (as they can fly without prior feeding), but will instead force them to fly further than they would otherwise do (to find nearby fresh pine shoots), thus disseminating the PWN over a larger area.

In conclusion, this study shows that the maturation period is a key phase for energy acquisition and allocation to reproduction in this long-lived coleopteran. There is no apparent trade-off between dispersal and reproduction during the maturation period. *M. galloprovincialis* is thus a capital disperser and an income breeder. Dispersal capacity seems

to be determined principally by the construction of the flight apparatus during the larval stage and is thus conditioned by larval feeding. Moreover, the investment of capital resources in the construction of foraging capacity before the maturation period allows the insect to devote most of its income resources to the reproductive effort, using whatever remains for the adjustment of foraging behaviour to resource availability.

6. Acknowledgements

We thank Christophe Chipecaux, Fabrice Vetillard and Elorri Segura for their valuable help with the flight mill device and laboratory analyses. We also thank Bastien Castagneyrol for his helpful comments on early versions of the manuscript. G.D. was supported by a grant from the French Ministry of Agriculture, Food and Forestry. This study was financed through a grant from the European Union Seventh Framework Programme FP7 via the Project REPHRAME (grant agreement 265483). The authors declare that they have no conflict of interest. All experiments were performed in compliance with the current laws of France and all animal experiments have been conducted in conformity with the “Guiding principles in the care and use of animals” approved by the Council of the American Physiological Society.

7. References

- Akbulut S, Keten A, Stamps WT (2008) Population dynamics of *Monochamus galloprovincialis* Olivier (Coleoptera: Cerambycidae) in two pine species under laboratory conditions. *J Pest Sci* 81:115–121. doi: 10.1007/s10340-008-0195-z
- Atkins MD (1961) A study of the flight of the douglas-fir beetle *Dendroctonus pseudotsugae* hopk. (Coleoptera: Scolytidae): iii flight capacity. *Can Entomol* 93:467–474. doi: 10.4039/Ent93467-6
- Beenackers AMT, Van der Horst DJ, Van Marrewijk WJA (1984) Insect flight muscle metabolism. *Insect Biochem* 14:243–260. doi: 10.1016/0020-1790(84)90057-X
- Begon M, Townsend CR, Harper JL (2009) *Ecology: From Individuals to Ecosystems*. John Wiley & Sons
- Boggs C, Ross C (1993) The effect of adult food limitation on life-history traits in *Speyeria mormonia* (Lepidoptera, Nymphalidae). *Ecology* 74:433–441. doi: 10.2307/1939305
- Boggs CL (2009) Understanding insect life histories and senescence through a resource allocation lens. *Funct Ecol* 23:27–37. doi: 10.1111/j.1365-2435.2009.01527.x
- Boggs CL (1981) Nutritional and life-history determinants of resource allocation in holometabolous insects. *Am Nat* 117:692–709.
- Candy DJ, Becker A, Wegener G (1997) Coordination and integration of metabolism in insect flight. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 117:497–512. doi: 10.1016/S0305-0491(97)00212-5
- Chapman RF, Simpson SJ, Douglas AE (2013) *The insects: structure and function*. Cambridge University Press
- Coll M, Yuval B (2004) Larval food plants affect flight and reproduction in an oligophagous insect herbivore. *Environ Entomol* 33:1471–1476. doi: 10.1603/0046-225X-33.5.1471
- Crawley MJ (2012) *The R Book*. John Wiley & Sons

- David G, Giffard B, Piou D, Jactel H (2014) Dispersal capacity of *Monochamus galloprovincialis*, the European vector of the pine wood nematode, on flight mills. *J Appl Entomol* 138:566–576. doi: 10.1111/jen.12110
- Dixon AFG, Horth S, Kindlmann P (1993) Migration in Insects: Cost and Strategies. *J Anim Ecol* 62:182–190. doi: 10.2307/5492
- Ellers J, Van Alphen JJM (1997) Life history evolution in *Asobara tabida*: plasticity in allocation of fat reserves to survival and reproduction. *J Evol Biol* 10:771–785. doi: 10.1046/j.1420-9101.1997.10050771.x
- Evans HF, McNamara DG, Braasch H, et al. (1996) Pest Risk Analysis (PRA) for the territories of the European Union (as PRA area) on *Bursaphelenchus xylophilus* and its vectors in the genus *Monochamus*. *EPPO Bull* 26:199–249. doi: 10.1111/j.1365-2338.1996.tb00594.x
- Fadamiro HY, Chen L, O. Onagbola E, Graham L “FUDD” (2005) Lifespan and patterns of accumulation and mobilization of nutrients in the sugar-fed phorid fly, *Pseudacteon tricuspidis*. *Physiol Entomol* 30:212–224. doi: 10.1111/j.1365-3032.2005.00449.x
- Fischer H, Kutsch W (2000) Relationships between body mass, motor output and flight variables during free flight of juvenile and mature adult locusts, *Schistocerca gregaria*. *J Exp Biol* 203:2723–2735.
- Fischer K, O’Brien DM, Boggs CL (2004) Allocation of larval and adult resources to reproduction in a fruit-feeding butterfly. *Funct Ecol* 18:656–663. doi: 10.1111/j.0269-8463.2004.00892.x
- Glazier DS (1999) Trade-offs between reproductive and somatic (storage) investments in animals: a comparative test of the Van Noordwijk and De Jong model. *Evol Ecol* 13:539–555. doi: 10.1023/A:1006793600600
- Gu H, Hughes J, Dorn S (2006) Trade-off between mobility and fitness in *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae). *Ecol Entomol* 31:68–74. doi: 10.1111/j.0307-6946.2006.00761.x

- Guerra PA (2011) Evaluating the life-history trade-off between dispersal capability and reproduction in wing dimorphic insects: a meta-analysis. *Biol Rev* 86:813–835. doi: 10.1111/j.1469-185X.2010.00172.x
- Ims RA (1995) Movement patterns related to spatial structures. In: Hansson L, Fahrig L, Merriam G (eds) *Mosaic Landsc. Ecol. Process.* Springer Netherlands, pp 85–109
- Jactel H, Gaillard J (1991) A preliminary study of the dispersal potential of *Ips sexdentatus* (Boern) (Col., Scolytidae) with an automatically recording flight mill. *J Appl Entomol* 112:138–145. doi: 10.1111/j.1439-0418.1991.tb01039.x
- Jervis MA, Boggs CL, Ferns PN (2005) Egg maturation strategy and its associated trade-offs: a synthesis focusing on Lepidoptera. *Ecol Entomol* 30:359–375. doi: 10.1111/j.0307-6946.2005.00712.x
- Jervis MA, Boggs CL, Ferns PN (2007) Egg maturation strategy and survival trade-offs in holometabolous insects: a comparative approach. *Biol J Linn Soc* 90:293–302. doi: 10.1111/j.1095-8312.2007.00721.x
- Jervis MA, Ellers J, Harvey JA (2008) Resource acquisition, allocation, and utilization in parasitoid reproductive strategies. *Annu Rev Entomol* 53:361–385. doi: 10.1146/annurev.ento.53.103106.093433
- Johnson CG (1969) *Migration and dispersal of insects by flight.* xxii+763 pp.
- Khuhro NH, Biondi A, Desneux N, et al. (2014) Trade-off between flight activity and life-history components in *Chrysoperla sinica*. *BioControl* 1–9. doi: 10.1007/s10526-014-9560-4
- Marden JH (2000) Variability in the Size, Composition, and Function of Insect Flight Muscles. *Annu Rev Physiol* 62:157–178. doi: 10.1146/annurev.physiol.62.1.157
- Mole S, Zera AJ (1994) Differential resource consumption obviates a potential flight–fecundity trade-off in the sand cricket (*Gryllus firmus*). *Funct Ecol* 8:573–580. doi: 10.2307/2389917

- Naves P, de Sousa E, Quartau J a. (2006a) Reproductive traits of *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera: Cerambycidae) under laboratory conditions. *Bull Entomol Res* 96:289–294. doi: 10.1079/BER2006422
- Naves PM, Camacho S, De Sousa EM, Quartau JA (2007) Transmission of the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* through feeding activity of *Monochamus galloprovincialis* (Col., Cerambycidae). *J Appl Entomol* 131:21–25. doi: 10.1111/j.1439-0418.2006.01111.x
- Naves PM, De Sousa EM, Quartau JA (2006b) Feeding and oviposition preferences of *Monochamus galloprovincialis* for certain conifers under laboratory conditions. *Entomol Exp Appl* 120:99–104. doi: 10.1111/j.1570-7458.2006.00430.x
- R development core team. (2013). R: A language and environment for statistical computing.
- Rankin MA, Burchsted JCA (1992) The cost of migration in insects. *Annu Rev Entomol* 37:533–559. doi: 10.1146/annurev.en.37.010192.002533
- Raubenheimer D (1995) Problems with Ratio Analysis in Nutritional Studies. *Funct Ecol* 9:21. doi: 10.2307/2390086
- Ronce O (2007) How does it feel to be like a rolling stone? Ten questions about dispersal evolution. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 38:231–253.
- Sousa E, Bonifácio L, Pires J, et al. (2001) *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda; Aphelenchoididae) associated with *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera; Cerambycidae) in Portugal. *Nematology* 3:89–91. doi: 10.1163/156854101300106937
- Yukilevich R (2005) Dispersal evolution in fragmented habitats: the interplay between the tendency and the ability to disperse. *Evol Ecol Res* 7:973–992.
- Zera AJ, Denno RF (1997) Physiology and ecology of dispersal polymorphism in insects. *Annu Rev Entomol* 42:207–230. doi: 10.1146/annurev.ento.42.1.207

Chapitre III

Maintien des capacités de vol durant la vie adulte : Effet de l'âge sur les capacités de dispersion de *Monochamus galloprovincialis*

Titre : Dispersal capacity of *Monochamus galloprovincialis*, the European vector of the pine wood nematode, on flight mills. G. David, B. Giffard, I. van Halder, D. Piou, H. Jactel. Article publié dans *Journal of Applied Entomology*

Objectif : Etudier les capacités de dispersion des adultes matures de *M. galloprovincialis*.

Résumé : Le nématode du pin (*Bursaphelenchus xylophilus*), responsable d'un dépérissement massif des pins là où il a été introduit, est mondialement reconnu comme un ravageur forestier important. Il a été introduit au Portugal en 1999, et il est transmis d'arbres en arbres presque exclusivement par les longicornes du genre *Monochamus*, dont *M. galloprovincialis* (Coleoptera: Cerambycidae) dans les forêts de pin maritime en Europe. Des estimations précises de la capacité de vol de cet insecte vecteur sont nécessaires si l'on veut comprendre et prédire la propagation de la maladie.

A l'aide de manèges de vol, nous avons évalué la distance parcourue, la probabilité de vol ainsi que la vitesse de *M. galloprovincialis* tout au long de la vie adulte. Nous avons également étudié les effets de l'âge, du sexe et du poids des insectes sur ces performances de vol qui sont un proxy de la capacité de dispersion.

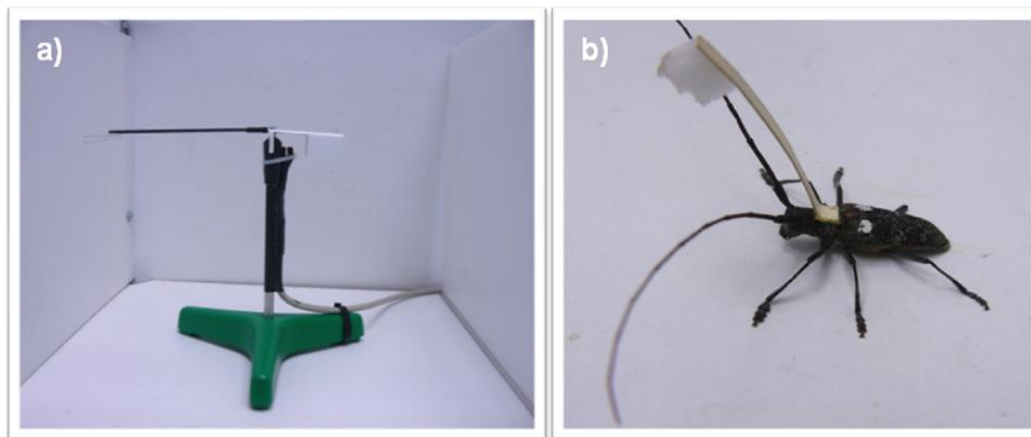
Nous avons pu mettre en évidence une importante variabilité intra-population des performances de vol chez *M. galloprovincialis*, avec une distance moyenne de 16 kilomètres parcourus pour l'ensemble de la durée de vie de l'insecte. L'âge et le poids ont un effet significativement positif sur les capacités de vol. Cependant l'ensemble de ces performances de vol ne diffère pas entre mâles et femelles.

Nous avons ensuite discuté l'importance de ces résultats pour la gestion du nématode du pin dans les forêts européennes

.

Encart 2 : Les manèges de vol

Dans le cadre de cette thèse nous avons mis au point des manèges de vol :



Manège de vol a) et insecte avec son attache en carton b)

Un support en acier a été utilisé comme axe vertical, au-dessus du quel un roulement à billes a été fixé. Le bras est constitué d'une tige horizontale de carbone, pesant 1,8 g. Cette tige est de 16 cm de long, donc un tour complet correspond à 1 m. De l'autre côté du roulement à billes, un contrepoids de 7,3 g a été fixé à 4,5 cm de l'axe, permettant ainsi d'équilibrer le dispositif grâce au principe du moment de la force. Un petit morceau de mousse a été collé à l'extrémité de la tige horizontale. Une petite bande de carton a été collée sur le pronotum de l'insecte. Un autre morceau de mousse est fixé à l'autre extrémité de la bande. L'insecte a été ensuite fixé au manège de vol, par l'assemblage des deux pièces de mousse avec une épingle entomologique. Chaque manège a été placé dans une boîte de 45 cm x 50 x 38 fabriquée à partir de panneaux de PVC blanc, afin de minimiser la turbulence de l'air et de fournir l'éclairage le plus homogène possible. Nous avons utilisé un total de huit manèges montés en parallèle, dans une chambre climatisée avec des conditions contrôlées de température (25 ± 1 °C). La rotation de la tige en carbone a été détectée par un capteur photoélectrique (Vishay CNY37) fixé à l'axe vertical du dispositif et relié à une Raspberry pi ® pour l'acquisition de données. Un programme C++ a été écrit afin d'enregistrer les données de durée de vol, de distance et de vitesse.

Ce dispositif nous a ainsi permis d'étudier en environnement contrôlé l'effet de caractéristiques intrinsèques à l'individu comme le sexe, l'âge, la taille ou le poids sur les performances de vol de *M. galloprovincialis*.

1. Abstract

The pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*), which causes the symptoms of pine wilt disease, is recognized worldwide as a major forest pest. It was introduced into Portugal in 1999. It is transmitted between trees almost exclusively by longhorn beetles of the genus *Monochamus*, including, in particular, *M. galloprovincialis* (Coleoptera: Cerambycidae) in maritime pine forests. Accurate estimates of the flight capacity of this insect vector are required if we are to understand and predict the spread of pine wilt disease in Europe.

Using computer-linked flight mills, we evaluated the distance flown, the flight probability and speed of *M. galloprovincialis* throughout adulthood, and investigated the effects of age, sex and body weight on these flight performances which are proxies for dispersal capacity.

The within-population variability of flight performance in *M. galloprovincialis* was high, with a mean distance of 16 km flown over the lifetime of the beetle. Age and body weight had a significant positive effect on flight capacity, but there was no difference in performance between males and females.

These findings have important implications for managing the spread of the pine wood nematode in European forests.

Keywords: Pine wilt disease, *Pinus pinaster*, pine sawyer, flight capacity, body weight

2. Introduction

The pine wood nematode (PWN), *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner and Buher) Nickle, is currently the most important threat to pine forests in southern Europe. Since its establishment in Portugal in 1999 and despite continuous control and containment measures, it now occupies a major part of the country (Mota et al., 2009). In its native area in North America, PWN is a secondary pathogen, infecting only native trees that are stressed or have recently died (Bergdahl, 1988). By contrast, the pine wilt disease caused by PWN has already led to the deaths of millions of native pine trees in the Asian countries into which it has been introduced (Japan, China, Taiwan, South Korea) (Togashi and Shigesada, 2006). In Japan, the volume of damaged timber had reached 2.4 million m³ per year and 500,000 ha of pine forest had been infested by the 1980s (Togashi and Shigesada, 2006). Soliman et al. (2012) estimated that the cumulative cost of wood loss due to PWN in Europe could reach 22 billion Euros over a period of 22 years (2008-2030), assuming that no regulatory control measures were taken. In the US, the incidence of pine wilt on exotic, European pine species, such as *Pinus sylvestris* and *P. nigra*, is also increasing, particularly after periods of drought and high summer temperatures (James et al., 2006).

After their successful establishment, invasive species may colonize large territories. Knowledge of the rate of spread is critical, for organization of the monitoring of invaded areas and the development of containment measures (Evans et al., 1996; Økland et al., 2010). For example, in Europe, proposals have been put forward to limit the extension of the PWN range through contingency plans, including precautionary clearcuts of all susceptible trees in a radius of 500 m around a detected infected tree and a survey of newly infected trees in a buffer area with a radius of 20 km (Anonymous, 2012).

Human-mediated dispersal has already been shown to play a key role in the spread of PWN, mostly through the transport of contaminated wood material (Robinet et al., 2009). Accidental anthropogenic dispersal usually spreads invasive species over very long distances. In the case of PWN in China, this type of long-distance spread was estimated to have occurred over distances of more than 100 km (Robinet et al., 2009). However, in natural conditions, PWN is transmitted between trees almost exclusively by longhorn beetles of the genus *Monochamus* (Coleoptera: Cerambycidae) (Linit, 1988). Other families of beetles have been shown to carry PWN, but none to transmit it (Kobayashi et al., 1984; Linit et al., 1983).

The spread of the nematode at the landscape scale is therefore mostly dependent on the flight capacities of its insect vector. Little information is currently available concerning the flight performances of the European insect vector, *M. galloprovincialis* Olivier (Gallego et al., 2012; Mas et al., 2013). The dispersal capacities of one of the principal North American vector, *M. carolinensis*, and the Asian vector, *M. alternatus*, have been estimated at about 2 to 3 km (Takasu et al. 2000; Linit and Akbulut 2003), but it is difficult to extrapolate these results to other *Monochamus* species because they have different anatomy and the native ranges of these beetles differ considerably in terms of their climate and forest cover conditions.

Two principal methods are generally used to estimate forest insect flight performance. The first is based on mark-release-recapture experiments (Ogawa and Hagiwara, 1980; Togashi, 1990a). Such experiments can be carried out in natural conditions, but are intrinsically limited by the number of traps and their distance from the release point (Franzen and Nilsson, 2007), resulting in insects often being trapped after they have covered shorter distances than they could actually have flown (Yamamura et al., 2003). Release-recapture methods therefore generally underestimate flight capacity (Ranius, 2006). The second method, based on flight mill trials carried out under laboratory conditions (Vogt et al., 2000; Yamanaka et al., 2001), may overestimate the distance flown because insects are tethered and, therefore, do not have to support their own weight and are forced to fly by the lack of tarsal contact (Edwards, 2006). Nevertheless, Taylor et al. (2010) showed that flight mills could 2-3 times underestimate flight speed compared to free flight. Using this technique, Akbulut and Linit (1999) estimated mean flight capacity of unmated mature *M. carolinensis* at 3.7 km in six hours of testing. The maximum flight performance of *M. alternatus* on flight mills was 3.3 km (Enda, 1985). Flight mills have proved useful for estimating maximal flight capacities for different insect species and, because they are used under strictly standardized conditions, they have also been proven valuable for evaluations of the effect on flight performance of endogenous factors, such as sex (Senger et al., 2007), size (Boggs and Freeman, 2005) and development stage (Hughes and Dorn, 2002).

The main objective of this work was therefore to estimate, for the first time, the mean and maximal flight capacities of *M. galloprovincialis*, the European vector of PWN, over its entire adult lifespan, on computer-monitored flight mills. After emergence, adult *M. galloprovincialis* beetles spend about three weeks feeding on pine shoots, during which time

they mature and start inoculating healthy trees with nematodes. They then mate and continue to transmit the PWD to new trees (Evans et al., 1996; Naves et al., 2007). The spread of the disease is therefore mostly dependent on insect vector dispersal following this maturation phase. Furthermore, Akbulut and Linit (1999) showed that the flight performance of mature *M. carolinensis* was significantly better than that of immature beetles, suggesting that feeding during maturation improved flight capacity. We therefore conducted our flight mill tests on mature beetles, to obtain the best possible estimate of the maximum dispersal performances of *M. galloprovincialis*.

3. Materials and Methods

3.1. Insect material

Adult beetles were obtained from fresh deadwood of maritime pine *Pinus pinaster*, collected from three spatially close pine stands in Cestas, France (44° 44' 43" N; 0° 40' 52" W) in January and February 2012. Logs were stored in a climatic chamber until the beetles emerged (temperature $21 \pm 1^\circ\text{C}$ and L:D 16h:8h photoperiod). Newly emerged adult insects were collected daily, weighed to the nearest 0.0001 g with a precision balance (Mettler Toledo, Semi-Micro MS205DU) and marked individually with white coded spots painted on the elytra. The sex of the beetles and the length of their right elytron were also recorded. Beetles were reared in plastic boxes (35 × 45 × 24 cm), with a maximum of 10 beetles per box, all the beetles in a given box being of the same sex. Boxes were stored in a climatic chamber, under the same controlled conditions as for the pine logs. The beetles were supplied *ad libitum* with fresh maritime pine shoots during the 30 days before the first flight recording and between two consecutive flight recordings. In total, we used 35 males and 26 females of *M. galloprovincialis* in the flight tests. The flight mill design was adapted from that described by Atkins (1961) and Jactel and Gaillard (1991) (see Encart2 for a detailed protocol).

3.2. Flight mill recordings

A flight recording session lasted two hours because none of the beetles tested was capable of flying for longer than that within a single session. Each beetle was subjected to flight mill recordings once weekly, every week until its death. We tested only unmated mature insects, so flight recordings began 30 days after emergence (P. Naves et al., 2006). Flight was initiated by gentle air flow in front of the beetle's head, and each time the animal stopped

flying, flight was reinitiated in the same way, until exhaustion of the beetle. All insects were weighed before and after each flight recording session. For each insect, we analyzed flight performance (total distance flown and mean speed) over the entire adult lifespan (total flight performances) and separately, for each of the 2-hour sessions. Beetles were considered to be “fliers” if they were able to complete at least one individual flight lasting more than 30 s in at least three sessions.

3.3. Statistical analyses

Total flight performances

The total distance flown was the sum of distances flown in successive recording sessions during the entire adult lifespan. The average flight speed was averaged across all individual flights.

Beetle body weight and size (elytron length) were highly correlated at beetle emergence ($R^2 = 0.76$, $P < 0.001$) and could therefore not be used as independent variables in the same model. We therefore only used beetle body weight, focusing on this variable because it might be modified by feeding and flying, thus influencing flight performance.

We assessed the effects of beetle’s weight at emergence, after 30 days of feeding (when the flight recordings started) and of relative weight gain ($RWG = (\text{weight at 30 days} - \text{weight at emergence}) / \text{weight at emergence}$) on total flight performances (probability of flying, total distance flown and average speed). To overcome the problem of collinearity, each of these three explanatory variables was tested in three separate models, each time in interaction with the fixed effect of sex in order to test for their effects on the three variables of flight capacity. The probability of flying, i.e., the probability of making at least one individual flight of more than 30 s duration in three sessions during the entire adult lifespan, was tested with a binomial generalised linear model (GLM) with a logit link. Total distance flown, which was square root-transformed, and mean speed were tested with linear models. We checked that the residuals of the linear models complied with the assumptions of normality and homoscedasticity.

Flight performance in 2-hour recording sessions

The use of data from separate recording sessions made it possible to investigate the effect of the beetle’s age on flight performance. However, model residuals were temporally

correlated, because each individual beetle was tested several times during its life. We therefore applied mixed effect models with the temporal replication of measures in the same individual (Pinheiro and Bates, 2000), using the lmer function of R package lme4 (Bates et al., 2012). We used a continuous random effect, according to which the age of the beetle provided a continuous representation of flight replications within each individual beetle. We tested the fixed effects of sex, age (number of days since emergence), body weight before the recording session and their interactions on the four flight parameters (probability of flying, mean speed, distance flown and the number of individual flights per session). The probability of flying was assessed with a generalised linear mixed effect model fitted with a binomial distribution and a Laplace approximation. The total distance flown per session, after square root transformation, and mean flight speed were analysed with linear mixed models. The number of individual flights per session and the mean distance flown per individual flight per session were also determined, after square root transformation, with linear mixed models.

All the insects were weighed before and after each recording session, and relative body weight loss was estimated as $RWL = (\text{weight before flight} - \text{weight after flight}) / \text{weight before flight}$. We used a linear mixed effect model to investigate the effect of distance flown, sex, and age (and their interactions) on RWL, with age treated as a continuous random effect.

We tested for an exhaustion effect on flight performance within each recording session, by studying the relationship between the distance flown during each individual flight and the rank of the corresponding flight (*i.e.*, first, second, etc. flight within a single session). The distance flown was square root-transformed and the linear mixed effect model included flight rank as a continuous variable and beetle age, sex and their interactions as fixed effects, and beetle age and flight rank as continuous slope random effects within each individual beetle.

In all models, we applied a model simplification procedure, removing non significant interaction terms. When the interaction term $\text{sex} \times \text{continuous variable}$ was significant, the effect of the continuous explanatory variable has been tested for males and females separately using model contrasts. The significance of each term effect was tested by comparing the deviances of models fitted with and without each effect term (Zuur et al., 2009), by ANOVA for linear models (F-value) or χ^2 tests for GLM, generalised and linear mixed models (Zuur et al., 2009). All statistical analyses were carried out in the R statistical environment (R development core team., 2013).

4. Results

4.1. Total flight performances

The proportion of *M. galloprovincialis* adults classified as fliers on the flight mill was 77% (47 flyers out of 61 tested insects), with no significant difference between sexes (tables 1 and 2). The total distance flown during entire adult lifespan (99.5 ± 4 days since emergence) was 15.6 km, on average, for males, and 16.3 km for females (no significant difference between sexes; table 2), with a maximum flight distance of 62.7 km recorded for a male (table 1). Half of the tested population covered total flight distances exceeding 11.4 km (table 1, fig. 1a). The average speed was similar in males and females (table 2), at about 1.4 m/s or 5 km/h (table 1).

Table 1. General flight parameters

	Total cumulated flights for flyers		Cumulated flights per recording session		Individual flights	
	Females n = 20	Males n = 27	Females n = 169	Males n = 197	Females n = 325	Males n = 316
Total distance flown (km)						
mean (\pm SE)	16.26 \pm 2.70	15.59 \pm 2.90	1.93 \pm 0.12	2.14 \pm 0.14	1.00 \pm 0.05	1.33 \pm 0.08
median	12.37	10.46	1.53	1.72	0.72	0.81
maximum	44.85	62.72	6.80	8.54	4.33	8.54
Flight speed (m/s)						
mean (\pm SE)	1.43 \pm 0.06	1.35 \pm 0.05	1.36 \pm 0.03	1.36 \pm 0.03	1.33 \pm 0.02	1.37 \pm 0.02

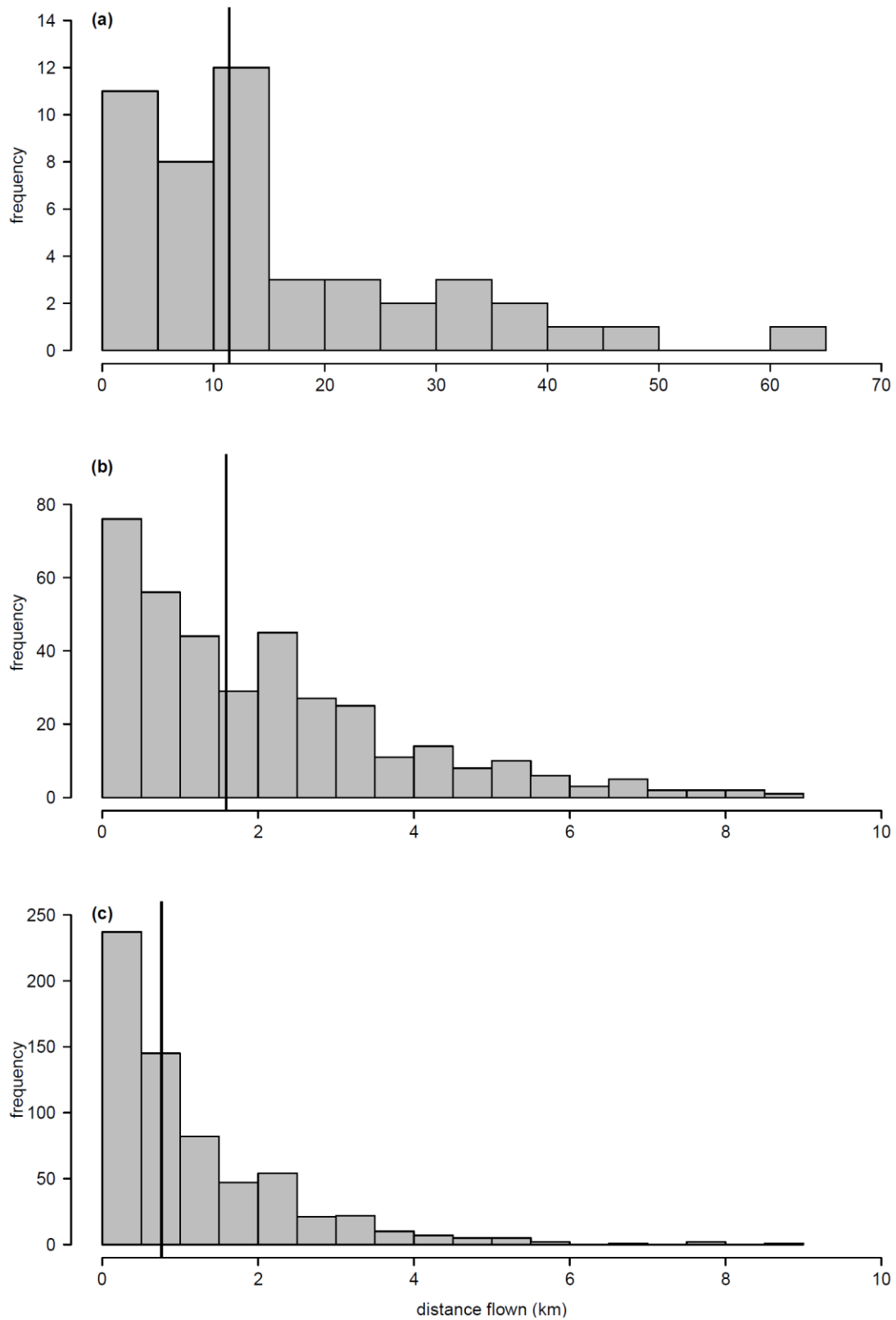


Fig. 1 Histogram of the frequency of distances flown for **(a)** total lifespan, **(b)** each flying session, and **(c)** each individual flight. The black line shows the median value: 11.4 km for **(a)**, 1.6 km for **(b)**, 0.8 km for **(c)**.

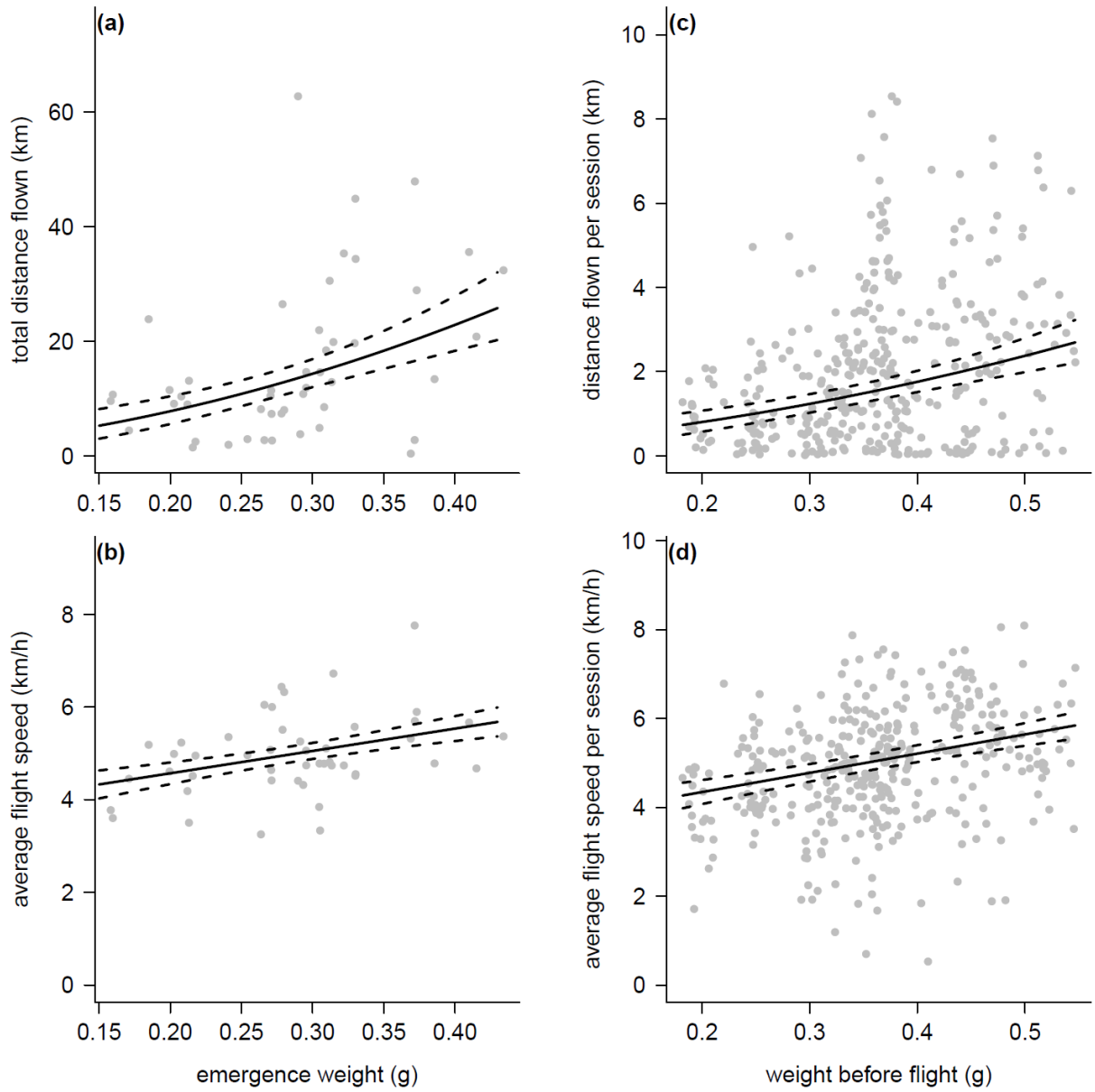


Fig. 2 Effects of emergence weight (W_0) on **(a)** total distance flown (total distance flown = $(9.95 \times W_0 + 0.90)^2$) and **(b)** average flight speed (average flight speed = $1.34 \times W_0 + 1.04$) during its entire lifespan, and of weights at the start of each flying session (W) on **(c)** distance flown (distance flown per session = $(0.15 \times W + 0.36)^2$) and **(d)** average flight speed (average flight speed per session = $1.10^{-3} \times W + 0.86$) per session. The solid lines correspond to the model predictions and the dotted lines indicate the standard errors.

The probability of an insect flying was not affected by its body weight (table 2). For both *M. galloprovincialis* flying males and females, the total distance flown increased significantly with body weight at emergence (table 2, fig. 2a), but was not affected by relative weight gain over this 30-day period (table 2).

For *M. galloprovincialis* flying males, the total distance flown significantly increased with body weight at 30 days but not for *M. galloprovincialis* flying females (table 2). For both males and females, flight speed increased significantly with *M. galloprovincialis* body weight at emergence (fig. 2b) and at 30 days (table 2, at a greater rate for females than for males), but was not affected by the relative weight gain over this 30-day period (table 2).

4.2. Flight performances in individual recording sessions

The total distance flown during a recording session averaged 2.1 km for males and 1.9 km for females, with no significant difference between sexes (table 3). The maximum flight distances recorded were 8.5 km for a male and 6.8 km for a female (table 1). Half the population tested covered flight distances exceeding 1.6 km in an individual session (table 1, fig. 1b). The average speed was similar in males and females (table 3), at about 5 km/h (table 1). Except for the average distance flown per individual flights per session, we observed no significant effect of sex (tables 1 and 3), or of an interaction between sex and age on any flight parameter in individual sessions.

The probability of flying, the distance flown per session and the flight speed were not affected by beetle age (table 3).

Body weight at the start of the flying session had a significant, positive effect on the total distance flown per session (fig. 2c) and on average flight speed (fig. 2d), but no effect on the probability of flying (table 3). The effects of weight and age on flight performance were independent, as suggested by non-significant interaction terms.

Relative loss of body weight (RWL) significantly increased with the distance flown ($\chi^2 = 62.27$, $df = 1$, $P < 0.001$) during the session concerned, regardless of the sex (interaction term: $\chi^2 = 1.27$, $df = 1$, $P = 0.26$), even if RWL was greater for females than for males ($\chi^2 = 30.53$, $df = 1$, $P < 0.001$; fig. 3). Beetle age had no effect on RWL ($\chi^2 = 1.43$, $df = 1$, $P = 0.23$).

Table 2. Summary of the results of linear and generalised linear models assessing the effects of sex, weight at emergence (W0), weight at 30 days (W30) and relative weight gain in between (RWG) on the total flight parameters. The three continuous explanatory variables were analysed in interaction with sex in three different models, due to collinearity (see Methods). The number of degrees of freedom equals 1 for all χ^2 tests (probability of flying) and, 43 or 44 for t-tests ($\sqrt{\text{distance flown}}$ and average speed) when the interaction term is significant or not, respectively. Estimates \pm SE, in the first line, and χ^2 or t-values, in the second line, are shown for continuous explanatory variables, but only χ^2 or t-values for the fixed effect of sex. Significant χ^2 and t-values are in bold characters (*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$).

	Sex	W0	W30	RWG
Probability of flying		$2.10^{-5} \pm 5.10^{-5}$		
	0.07	0.19	—	—
	0.02	—	2.5 ± 4.1 0.39	—
	0.01	—	—	0.5 ± 2.7 0.04
$\sqrt{\text{Distance flown}}$	0.21	10.0 ± 3.4 2.94 **	—	—
	0.01	—	— ⁺	—
	— ⁺	—	-3.5 ± 5.7 - 0.61	—
	females			
	— ⁺	—	10.8 ± 3.4 3.20 **	—
	males			
	1.02	—	—	-3.6 ± 2.2 -1.64
Average speed	1.21	1.3 ± 0.5 2.70 *	—	—
	0.38	—	— ^Δ	—
	— ^Δ	—	2.9 ± 0.8 3.62 ***	—
	females			
	— ^Δ	—	0.9 ± 0.5 2.05 *	—
	males			
	0.46	—	—	0.3 ± 0.3 0.84

⁺ significant interaction term: sex \times W30: $F_{1,43} = 4.64$ *

^Δ significant interaction term: sex \times W30: $F_{1,43} = 4.26$ *

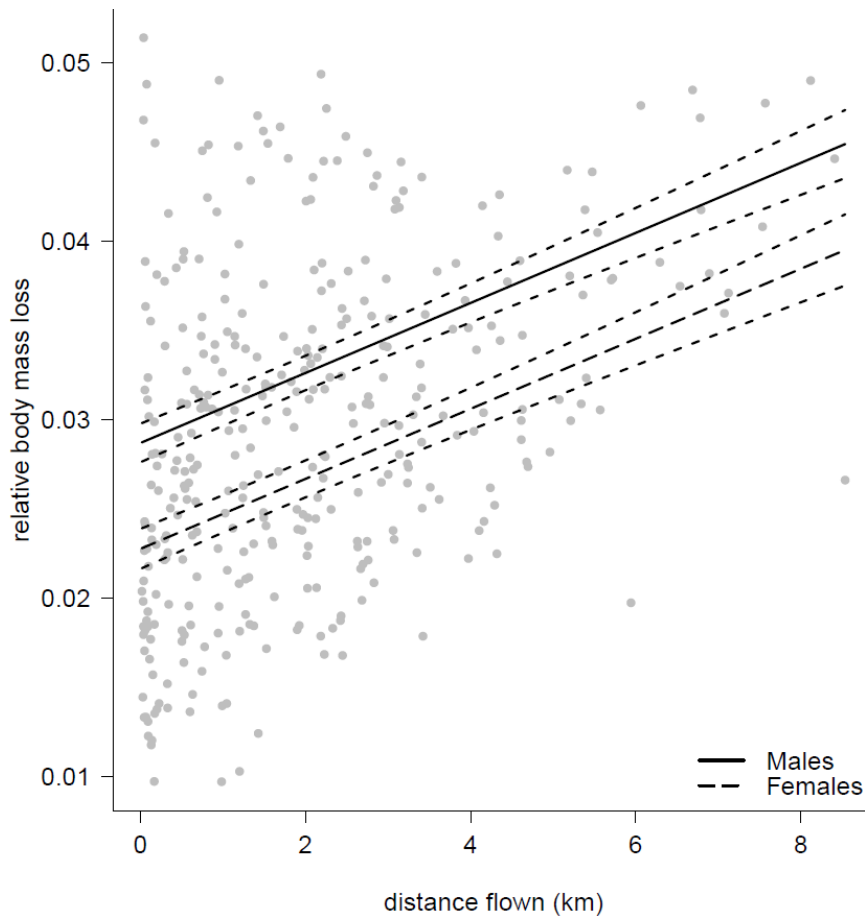


Fig. 3 Effect of distance flown on relative body mass loss per session for male and female beetles. The black lines correspond to the model prediction, with a solid line for males, ($RWL = 2.10^{-3} \times \text{distance flown} + 3.10^{-2}$) and a dotted line for females, $RWL = 2.10^{-3} \times \text{distance flown} + 2.10^{-2}$). The black short dotted lines indicate the standard errors.

4.3. *Individual flight characteristics*

Beetle age had a significant negative effect on the number of individual flights per recording session (table 3, fig. 4a), but the average distance covered in individual flights per session increased significantly with beetle age (table 3, fig. 4b) and with the weight before flight (table 3).

Table 3. Summary of the results of linear and generalised linear mixed models assessing the effects of sex, weight before flight and age on the flight performance in 2-hour recording sessions. Sex effect is represented by the estimate of the difference between males in comparison with female reference (Intercept). First line represents Estimate \pm SE of the fixed effect (columns) on the dependent variable (lines) and second line χ^2 values (all df = 1). Significant values are in bold (***) $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$).

	Intercept	Sex	Weight before flight	Age
Probability of flying	0.60 \pm 0.79	-0.37 \pm 0.31 1.41	1.15 \pm 1.84 0.39	- 0.003 \pm 0.004 0.65
$\sqrt{\text{Distance flown}}$	0.36 \pm 0.28	0.09 \pm 0.12 0.57	0.15 \pm 0.67 10.41 ***	7.10 ⁻⁴ \pm 1.10 ⁻³ 0.40
Average speed	0.86 \pm 0.14	0.02 \pm 0.06 0.17	1.20 \pm 0.35 12.03 ***	1.10 ⁻³ \pm 7.10 ⁻⁴ 2.12
$\sqrt{\text{Number of individual flight}}$	1.29 \pm 0.15	-0.11 \pm 0.06 2.82	0.29 \pm 0.37 0.64	-2.10 ⁻³ \pm 7.10 ⁻⁴ 4.85 *
$\sqrt{\text{Mean distance flown per individual flight per sessions}}$	0.14 \pm 0.20	0.17 \pm 0.08 4.26 *	1.68 \pm 0.48 12.26 ***	3.10 ⁻³ \pm 8.10 ⁻⁴ 9.40 **

Individual flight characteristics (distance and speed) did not vary with beetle age ($\chi^2 = 3.06$, df = 1, $P = 0.08$ and $\chi^2 = 1.29$, df = 1, $P = 0.26$, respectively) and did not differ significantly between males and females ($\chi^2 = 0.30$, df = 1, $P = 0.59$ and $\chi^2 = 0.13$, df = 1, $P = 0.72$, respectively), with mean values of 1.2 km and 5 km/h, respectively (table 1). Half the individual flights covered distances of more than 750 m (table 1, fig. 1c). Furthermore, flight rank within a session had a significant negative effect on the distance flown ($\chi^2 = 42.80$, df = 1, $P < 0.001$) and on the flight speed ($\chi^2 = 3.76$, df = 1, $P = 0.05$), consistent with a process of exhaustion (fig. 5).

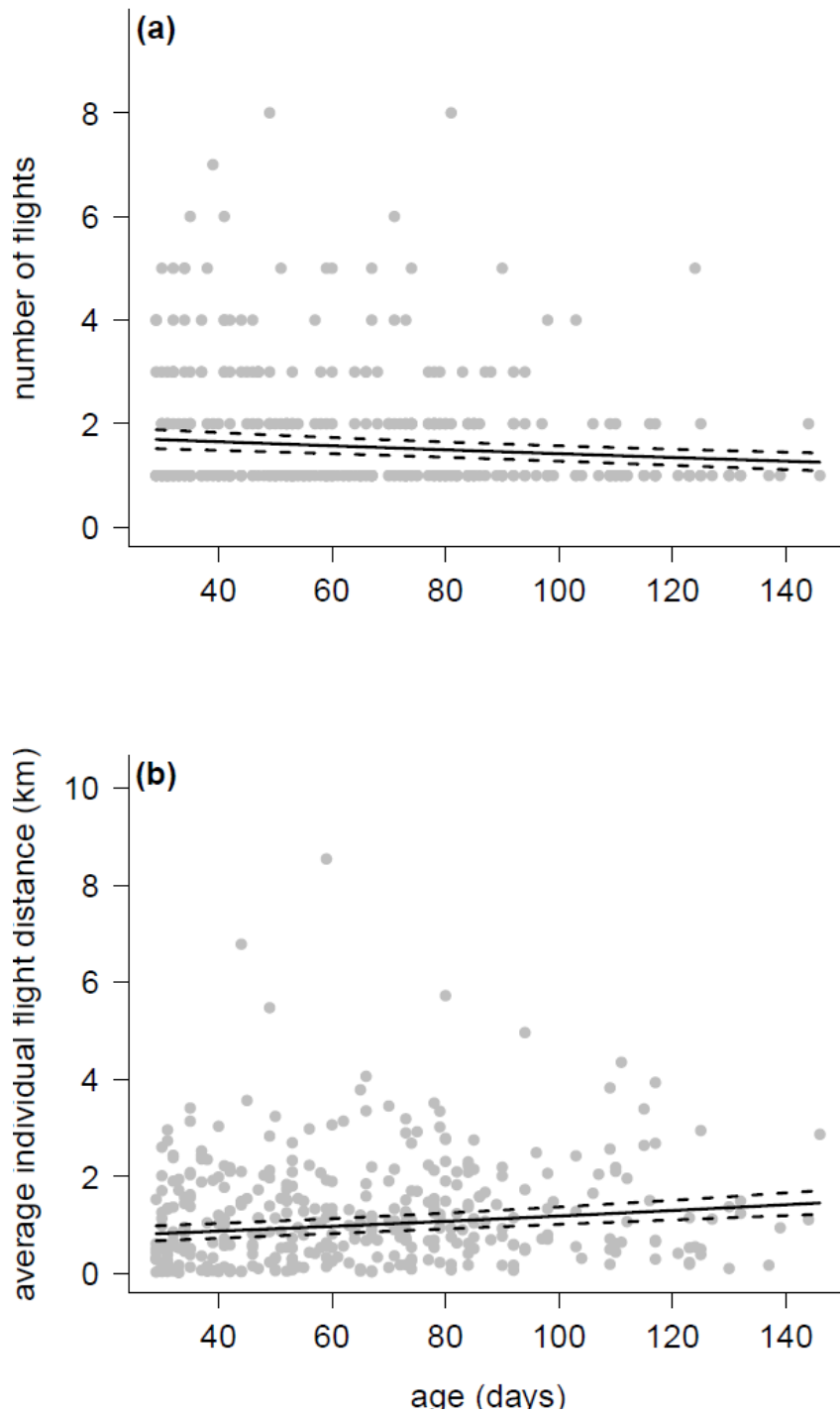


Fig. 4 Effect of beetle age on **(a)** number of flights per session, (number of flights = $(-2.10^{-3} \times \text{age} + 1.29)^2$) and **(b)** average individual flight distance per session, (average individual flight distance = $(3.10^{-3} \times \text{age} + 0.14)^2$). The solid line corresponds to the model prediction and the dotted lines indicate the standard errors.

5. Discussion

There is no ideal method for obtaining an accurate estimate of insect flight performance. Nevertheless, flight mills have two key advantages in that they provide benchmarks of maximal intrinsic flight capacity and facilitate the detection of differences in dispersal performances between individuals of different sexes or physiological statuses (Hughes and Dorn, 2002). Flight mills are supposed to provide an overestimate of the distance flown by insects. Insects are continuously stimulated to fly, due to permanent stimulation resulting from a lack of tarsal contact (Edwards, 2006) and flight performances recorded on flight mills are often an entire order of magnitude greater than those obtained in flight chambers (Shirai and Kosugi, 2000; Yamanaka et al., 2001) or in mark-release-recapture experiments (Botero-Garcés and Isaacs, 2004). However, these alternative methods generally provide underestimates of flight capacity, due to spatial constraints (size of the chamber, distance of traps from the release point, *e.g.*, (Franzen and Nilsson, 2007)). Furthermore, Taylor et al. (2010), based on an independent comparison of *Agrilus planipennis* flight performances between tethered and free flights, showed that flight mills could 2-3 times underestimate the flight speed.

Monochamus beetles are sometimes considered poor fliers (Akbulut and Stamps, 2012). In mark-release-recapture experiments on mature *M. alternatus*, most beetles were recaptured within 100 m (Ogawa and Hagiwara, 1980) or 800 m of the release point, (Kobayashi et al., 1984). These performances are similar to those of other longhorn beetles such as *Anoplophora glabripennis*, which seems to be able to cover about 1 km during its adult life (Smith et al., 2001), and *Rosalia alpina*, which may cover distances of up to 1.6 km (Drag et al., 2011). However, recent studies have suggested that longhorn beetles may actually have better flight performances. Mas et al. (2013) carried out several mark-release-recapture trials with *M. galloprovincialis* and found that most beetles could fly at least 3 km. They even recaptured some beetles at more than 20 km from their release point. These long-distance flights observed in nature essentially concern distances similar to those recorded in our flight mill experiments. We showed that *M. galloprovincialis* covered a mean distance of 16 km and a median distance of 11 km, in the laboratory, during its entire adult life span.

For daily sessions, Akbulut and Linit (1999) reported a mean distance of 3.7 km for unmated *M. carolinensis* on flight mills, a result consistent with the 2 km per 2 hours flying

session obtained for *M. galloprovincialis*. Taylor et al. (2010) also showed that *A. planipennis* could fly 1.3 km/day on flight mills.

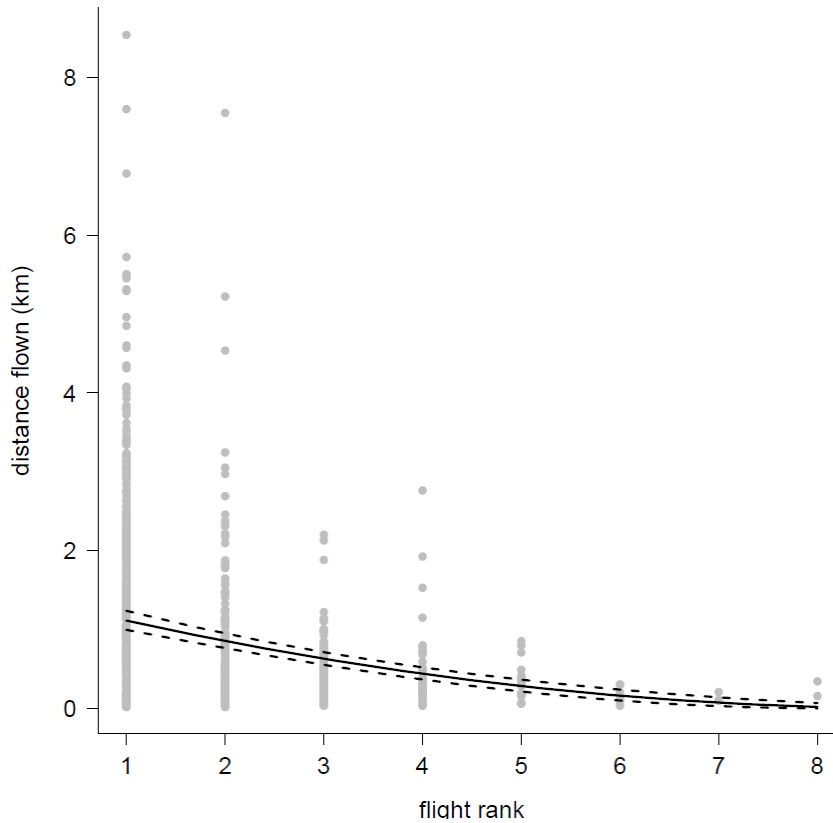


Fig. 5 Effect of flight rank within a flying session on distance flown (distance flown = $(-0.13 \times \text{flight rank} + 1.05)^2$). The solid line corresponds to the model prediction and the dotted lines indicate the standard errors.

For individual flights, Humphry and Linit (1989) reported a mean flight time for unmated mature *M. carolinensis* of 4 minutes, which would correspond to a distance of about 360 m for a flight speed of 1.5 m/s (Akbulut and Linit, 1999). This value is close to the 250 m/day observed by Mas et al. (2013) in the field, but much lower than our mean values of 1250 m obtained on flight mills with *M. galloprovincialis*. However, Mas et al. (2013) also recorded a maximum daily dispersal of about 1500 m. *M. galloprovincialis* (1.4 m/s) can fly as fast as *M. carolinensis* (1.5 m/s, (Akbulut and Linit, 1999)).

The European species, *M. galloprovincialis*, appears to have better individual flight performances than the American and Asian species of the same genus, *M. carolinensis* and *M. alternatus*, respectively. However, these other two species are smaller. *M. carolinensis* measures 13-25 mm \times 5-7 mm (Akbulut and Stamps 2012) and *M. alternatus* measures 15-

28 mm × 4-9 mm (Ciesla, 2001), whereas *M. galloprovincialis* measures 14-35 mm × 5-9 mm in width (personal data). Morphological traits, such as beetle size and wing loading, are known to determine flying ability (Dudley and Srygley, 1994; Shirai, 1995). Larger longhorn beetles might therefore be expected to fly for longer distances than smaller species, as confirmed by the intraspecific variations we detected in *M. galloprovincialis*. We found that the total distance flown by adult beetles increased significantly with body weight at emergence, which was highly correlated with elytron size ($R^2 = 0.76$, $P < 0.001$).

Monochamus body weight might also influence flight capacity, through differences in the amount of energy stored during maturation feeding. It has been shown, in a tropical beetle, *Stenotarsus rotundus*, that larger insects have a higher relative fat content (Nedved and Windsor, 1994), and Renault et al. (2003) showed that larger insects lose weight more slowly than smaller insects. The influence of energy stores on flight performance was confirmed indirectly by the comparison between males and females. For both males and females, the distance flown increased with increasing weight at emergence. In *M. galloprovincialis* females, the distance flown decreased with increasing weight at 30 days, whereas it increased for males. According to the energy allocation theory (Jervis et al., 2008), some insect species are "income breeders", allocating the energy acquired through feeding during the adult stage to different functions. Females generally have no eggs at emergence (they are synovigenic) and they initially invest their energy in ovogenesis (Jervis et al., 2001). Only the energy not required for investment in reproduction is allocated to flight activities, according to the "oogenesis-flight syndrome" (Johnson, 1969). *M. galloprovincialis* females are of this type, potentially accounting for the lack of relationship between weight gain and flight performance, despite the increase in body weight with age. By contrast, males do not have to divert any of the energy they require to reproductive maturation. There is therefore a consistent positive effect of body weight or weight gain on flight performance. This hypothesis of energy use during flight is well supported by our observation of a significant effect of distance flown on relative weight loss per session.

As in other tethered flight studies on *Monochamus* species (Akbulut and Linit, 1999; Humphry and Linit, 1989), we globally detected no effect of sex on mean flight performance. Likewise, in mark-release-recapture experiments, Togashi (1990b), Ogawa and Hagiwara (1980) and Mas et al. (2013) found no difference between the sexes in terms of field dispersal capacity. The mating status of females may be also important: for example Taylor et al.

(2010) found that mated females of *A. planipennis* flew longer than virgins whereas Akbulut and Linit (1999) found the opposite for *M. carolinensis*. In this study females were virgin and this may have under or overestimate the relative distances flown. Further studies are then needed to investigate the effect of mating status on the dispersal capacities of *M. galloprovincialis*.

By testing the same beetles once weekly until they died, we found a significant effect of age on flight capacity. The number of flights per session tended to decrease with age, but the mean individual flight distance flown per session increased, consistent with possible energy accumulation or physiological maturation effects. Beetles were fed between flight mill sessions and may therefore have gained more energy than they required for flying, resulting in an improvement in performance. However, we observed a decrease in the distance flown with increasing flight rank in individual sessions, consistent with the hypothesis that flight is energy-limited. By contrast, Humphry and Linit (1989), who carried out the only other study to investigate *Monochamus* flight performance as a function of beetle age, found no effect of age in mature beetles. They suggested that immature beetles were more active fliers than mature beetles. However, Akbulut and Linit (1999) reported the opposite finding, with 15-day-old *M. carolinensis* beetles flying more, on average, than immature, one-day-old beetles. It would therefore be of interest to investigate further the effects of sexual maturation and energy allocation on the dispersal performances of *M. galloprovincialis* after they have fed on pine shoots.

Overall, our results obtained on flight mills are consistent with those recently obtained in the field (Gallego et al., 2012; Mas et al., 2013), showing that *M. galloprovincialis* may cover distances of several tens of kilometers during its adult lifespan. These findings may have important implications for managing the spread of PWN in European forests. Precautionary clearcuts have been proposed as a way of preventing the extension of infestation foci. If the radius of these clearcuts around infested trees is to be adjusted according to the individual flight capacity of the insect vector, then the proposed 500 m is too small, given the mean flight distance of about 1.3 km in *M. galloprovincialis*. It is also far too small if we consider that beetles can fly, stop and resume flying throughout their entire lifespan, covering a total distance of about 15 km, on average. Økland et al. (2010) demonstrated that a high probability of PWN eradication would require unrealistic measures, such as a host tree removal radius of 8 km around each detection point. However, our study suggests that even 4

km would be too small. These findings clearly call into question the relevance of precautionary clearcuts.

6. Acknowledgements

We are grateful to Christophe Chipeaux and Fabrice Vetillard for their help with the flight mill device. G.D. was supported by a grant from French Ministry of Agriculture, Food and Forestry. This study was financed through a grant by the European Union Seventh Framework Programme FP7 via the Project REPHRAME (grant agreement 265483).

7. References

- Anonymous, 2012. Commission implementing decision on emergency measures to prevent the spread within the Union of *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhrer) Nickle *et al.* (the pine wood nematode). Official Journal of the European Union. L 266/442-452.
- Akbulut S, Linit MJ, 1999. Flight performance of *Monochamus carolinensis* (Coleoptera: Cerambycidae) with respect to nematode phoresis and beetle characteristics. Environ. Entomol. 28, 1014-1020.
- Akbulut S, Stamps WL, 2012. Insect vectors of the pinewood nematode: a review of the biology and ecology of *Monochamus* species. Forest Path. 42, 89-99.
- Atkins MD, 1961. A study of the flight of the Douglas-fir beetle *Dendroctonus pseudotsugae* Hopk. (Coleoptera: Scolytidae) III flight capacity. Can. Entomol. 93, 467-474.
- Bates D, Maechler M, Bolker B, 2013. lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and R syntax. R package version 0.999999-2.
- Bergdahl DR, 1988. Impact of the pine wood nematode in North America: present and future. J. Nematol. 20, 260-265.
- Boggs CL, Freeman KD, 2005. Larval food limitation in butterflies: Effects on adult resource allocation and fitness. Oecologia. 144, 353-361.
- Botero-Garcés N, Isaacs R, 2004. Movement of the grape berry moth, *Endopiza viteana*: displacement distance and direction. Physiol. Entomol. 29, 443-452.
- Ciesla WM, 2001. EXFOR Database Pest Report: *Monochamus alternatus*. USDA Forest Service. [WWW document]. URL <http://spfnic.fs.fed.us/exfor/data/pestreports.cfm?pestidval=77&langdisplay=english>
- Drag L, Hauck D, Pokluda P, Zimmermann P, Cizek L, 2011. Demography and dispersal ability of a threatened saproxylic beetle: a mark-recapture study of the Rosalia longicorn (*Rosalia alpina*). PLoS One. 6, e21345.

- Dudley R, Srygley RB, 1994. Flight physiology of neotropical butterflies: allometry of airspeeds during natural free flight. *J. Exp. Biol.* 191, 125-139.
- Edwards JS, 2006. The central nervous control of insect flight. *J. Exp. Biol.* 209, 4411-4413.
- Enda N, 1985. The flight ability of the Japanese pine-sawyer (Coleoptera, Cerambycidae) as determined by a flight-mill instrument. Transactions of the 96th Meeting of Japanese Forest Society. 517-518. In Zhao BG, Futai K, Sutherland JR, Takeuchi Y, 2008. Pine Wilt Disease. Springer, Japan.
- Evans HF, McNamara DG, Braasch H, Chadoeuf J, Magnusson C, 1996. Pest risk analysis (PRA) for the territories of the European Union (as PRA area) on *Bursaphelenchus xylophilus* and its vectors in the genus *Monochamus*. *EPPO Bull.* 26, 199-249.
- Franzen M, Nilsson SG, 2007. What is the required minimum landscape size for dispersal studies? *J. Anim. Ecol.* 76, 1224-1230.
- Gallego D, Sanchez-Garcia FJ, Mas H, Campo MT, Lencina YJL, 2012. Estudio de la capacidad de vuelo a larga distancia de *Monochamus galloprovincialis* (Olivier 1795). (Coleoptera: Cerambycidae) en un mosaico agro-forestal. *Bol. San. Veg. Plagas.* 38, 109-123.
- Hughes J, Dorn S, 2002. Sexual differences in the flight performance of the oriental fruit moth, *Cydia molesta*. *Entomol. Exp. Appl.* 103, 171-182.
- Humphry SJ, Linit MJ, 1989. Tethered flight of *Monochamus carolinensis* (Coleoptera: Cerambycidae) with respect to beetle age and sex. *Environ. Entomol.* 18, 124-126.
- Jactel H, Gaillard J, 1991. A preliminary study of the dispersal potential of *Ips sexdentatus* Boern (Col., Scolytidae) with an automatically recording flight mill. *J. Appl. Entomol.* 112, 138-145.
- Jervis MA, Heimpel GE, Ferns PN, Harvey JA, Kidd NAC, 2001. Life-history strategies in parasitoid wasps: a comparative analysis of 'ovigeny'. *J. Anim. Ecol.* 70, 442-458.
- Jervis MA, Ellers J, Harvey JA, 2008. Resource acquisition, allocation, and utilization in parasitoid reproductive strategies. *Annu. Rev. Entomol.* 53, 361-385.

- Johnson CG, 1969. Migration and Dispersal of insects by flight. Methuen, London.
- Kobayashi F, Yamane A, Ikeda T, 1984. The Japanese pine sawyer beetle as the vector of pine wilt disease. *Annu. Rev. Entomol.* 29, 115-135.
- Linit MJ, 1988. Nematode-vector relationships in the pine wilt system. *J. Nematol.* 20, 227-235.
- Linit MJ, Akbulut S, 2003. Pine wood nematode phoresis: the impact on *Monochamus carolinensis* life functions. *Nematol. Monogr. Persp.* 1, 227-237.
- Linit MJ, Kondo E, Smith MT, 1983. Insect associated with the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae), in Missouri. *Environ. Entomol.* 12, 467-470.
- Mas H, Hernandez R, Villaroya M, Sanchez G, Perez-laorga E, Gonzalez E, Ortiz A, Lencina JL, Rovira J, Marco M, Perez V, Gil M, Sanchez-garcia FJ, Bordon P, Pastor C, Biel MJ, Montagud L, Gallego D, 2013. Comportamiento de dispersión y capacidad de vuelo a larga distancia de *Monochamus galloprovincialis* (Olivier 1795). 6º Congreso forestal español. 6CFE01-393.
- Mota MM, Futai K, Vieira P, 2009. Pine wilt disease and the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. In: Ciancio A, Mukerji KG (eds) *Integrated management of fruit crops and forest nematodes*. Springer Science, pp 253-274.
- Naves PM, Sousa ED, Quartau JA, 2006. Reproductive traits of *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera: Cerambycidae) under laboratory conditions. *B. Entomol. Res.* 96, 289-294.
- Naves PM, Camacho S, de Sousa EM, Quartau JA, 2007. Transmission of the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* through feeding activity of *Monochamus galloprovincialis* (Col., Cerambycidae). *J. Appl. Entomol.* 131, 21-25.
- Nedved O, Windsor D, 1994. Supercooling ability, fat and water content in a diapausing tropical beetle *Stenotarsus rotundus* (Coleoptera: Endomychidae). *Eur. J. Entomol.* 91, 307-312.

- Ogawa S, Hagiwara Y, 1980. Expansion of the pine infestation caused by the pine wood nematodes. *Shirin Boeki (Forest pest)* 29, 115-117. in Togashi K, 1990. A field experiment on dispersal of newly emerged adults of *Monochamus alternatus* (Coleoptera : Cerambycidae). *Res. Popul. Ecol.* 32, 1-13.
- Økland B, Skarpaas O, Schroeder M, Magnusson C, Lindelöw A, Thunes K, 2010. Is eradication of the pinewood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*) likely? An evaluation of current contingency plans. *Risk. Anal.* 30, 1424-1439.
- Pinheiro JC, Bates DM, 2000. *Mixed-Effects Models in S and S-PLUS*. Springer, New York.
- R Core Team (2013). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- James R, Tisserat N, Todd T, 2006. Prevention of pine wilt of Scots pine (*Pinus sylvestris*) with systemic abamectin injections. *Arboric. Urban For.* 32, 195-201.
- Ranius T, 2006. Measuring the dispersal of saproxylic insects: a key characteristic for their conservation. *Popul. Ecol.* 48, 177-188.
- Renault D, Hance T, Vannier G, Vernon P, 2003. Is body size an influential parameter in determining the duration of survival at low temperatures in *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera: Tenebrionidae)? *J. Zool. Lond.* 259, 381-388.
- Robinet C, Roques A, Pan H, 2009. Role of human-mediated dispersal in the spread of the pinewood nematode in China. *PLoS One.* 4, e4646.
- Senger SE, Roitberg BD, Thistlewood HMA, 2007. Relative flight responses of *Rhagoletis indifferens* as influenced by crowding, sex, and resources. *Entomol. Exp. App.* 123, 91-100.
- Shirai Y, 1995. Longevity, flight ability and reproductive performance of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae), related to adult body size. *Res. Popul. Ecol.* 37, 269-277.
- Shirai Y, Kosugi Y, 2000. Flight activity of the smaller tea tortrix, *Adoxophyes honmai* (Lepidoptera: Tortricidae). *Appl. Entomol. Zool.* 35, 459-466.

- Smith MT, Bancroft J, Li G, Gao R, Teale S, 2001. Dispersal of *Anoplophora glabripennis* (Cerambycidae). *Environ. Entomol.* 30, 1036-1040.
- Soliman T, Mourits MCM, van der Werf W, Hengeveld GM, Robinet C, Oude Lansink AGJM, 2012. Framework for modelling economic impacts of invasive species, applied to pine wood nematode in Europe. *PLoS One.* 7, e45505.
- Takasu F, Yamamoto N, Kawasaki K, 2000. Modeling the expansion of an introduced tree disease. *Biol. Invasions.* 2, 141-150.
- Taylor RAJ, Bauer LS, Poland TM, Windell KN, 2010. Flight performance of *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae) on a flight mill and in free flight. *J. Insect. Behav.* 23, 128-148.
- Togashi K, 1990. A field experiment on dispersal of newly emerged adults of *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Res. Popul. Ecol.* 32, 1-13.
- Togashi K, Shigesada N, 2006. Spread of the pinewood nematode vectored by the Japanese pine sawyer: modeling and analytical approaches. *Popul. Ecol.* 48, 271-283.
- Vogt JT, Appel AG, West SM, 2000. Flight energetics and dispersal capability of the fire ant, *Solenopsis invicta* Buren. *J. Insect. Physiol.* 46, 697-707.
- Yamamura K, Mitsunobu K, Norio A, Futoshi K, Yasutsune S, 2003. Estimation of dispersal distance by mark-recapture experiments using traps: correction of bias caused by the artificial removal by traps. *Popul. Ecol.* 45, 149-155.
- Yamanaka T, Tatsuki S, Shimada M, 2001. Flight characteristics and dispersal patterns of fall webworm (Lepidoptera: Arctiidae) males. *Environ. Entomol.* 30, 1150-1157.
- Zuur AF, Ieno EF, Walker NJ, Saveliev AA, Smith GM, 2009. *Mixed Effects Models and Extensions in Ecology With R.* Springer, Germany.

Chapitre IV

Etude de la longévité de *Monochamus galloprovincialis* : Effet du réchauffement climatique sur la survie du vecteur du nématode du pin

Titre : Potential effects of climate warming on the survivorship of adult *Monochamus galloprovincialis*, vector of the pine wood nematode. G. David, B. Giffard, D. Piou, A. Roques, H. Jactel. *Article en préparation*.

Objectif : Etudier les effets de la température sur la longévité de ces insectes.

Résumé : Au cours des deux dernières décennies, les écologistes ont largement exploré les conséquences du changement climatique sur la distribution et la phénologie des espèces d'insectes. Alors que la plupart des études ont évalué l'effet de l'augmentation moyenne des températures sur les performances individuelles, la réponse aux variations temporelles de la température, y compris l'intensité et la fréquence des températures extrêmes, a été souvent négligée. Ici, nous émettons l'hypothèse que les performances des insectes peuvent augmenter avec la hausse des températures moyennes, mais diminuer dans des conditions thermiques à fortes fluctuations. Nous avons utilisé des armoires climatiques pour comparer le gain de poids et la longévité de *M. galloprovincialis* dans trois conditions climatiques contrôlées à la fois pour la température moyenne et l'amplitude des températures annuelles. Nos résultats ont montré que l'augmentation de 2,5 °C de la température moyenne n'a eu aucun effet sur le gain de poids et la survie de l'insecte. Cependant nous avons pu mettre en évidence qu'une augmentation de la variabilité des températures au cours de l'année influence négativement la longévité des *Monochamus* alors que le poids reste inchangé. Ceci suggère que l'effet du réchauffement climatique sur la survie de *M. galloprovincialis*, et ainsi sa capacité à propager le nématode du pin, est susceptible d'être plus influencé par les modifications la variabilité de la température plutôt que par l'augmentation de la température moyenne.

1. Abstract

Over the past two decades, ecologists have widely explored the consequences of climate change on insect species distribution and phenology. While most studies assessed the effect of increasing mean temperatures on individual performances, the response to temporal thermal patterns, including the magnitude and frequency of extreme temperatures, has been often overlooked. Here we hypothesized that insects' performances can increase with increasing mean temperatures but decrease under highly variable thermal conditions. We used a manipulative experiment to compare the longevity and weight gain of *Monochamus galloprovincialis* under three climatic conditions in which with both controlled for the mean and the range of yearly temperatures. Our results showed that an increase of 2.5 °C in average temperature had no effect on the survivorship and weight gain of the beetle. By contrast larger fluctuating variations of temperature across year resulted in significantly lower longevity, whereas weight gain remains unchanged. This suggests that the effect of global warming on the survival of *M. galloprovincialis*, and then its ability for disseminating the pine wood nematode, is likely to be driven by change in temperature stability rather than by mean temperature changes.

Key-words: Climate change, fluctuating thermal regimes, longevity, weight gain, performances

2. Introduction

Over the past two decades, ecologists have widely explored the consequences of global warming on species' distribution and phenology (Parmesan and Yohe, 2003) or on community diversity and ecosystem functioning (Lavergne et al., 2010). Most of them focused on the increase in average temperature (Morris et al., 2008). However, in addition to trends in mean values, temporal variation of temperature (i.e., diurnal, monthly and annual fluctuations) including the magnitude and frequency of extreme temperatures are also expected to change (Hansen et al., 2006). These temporal patterns have been considered more important for local persistence of species than a slight increase in average temperature (Hoffmann et al., 2002; Wang et al., 2009). Indeed, temperature fluctuations has been shown to affect the fitness or other performance-related traits of ectothermic species (Estay et al., 2011; Kingsolver et al., 2009; Paaijmans et al., 2013). While populations of insects are expected to increase more rapidly in a warmer world (Morris et al., 2008) higher thermal variability may compensate these effects and even result in negative influence on population growth and individual performances (Bozinovic et al., 2011; Deutsch et al., 2008; Ruel and Ayres, 1999; Thompson et al., 2013; Vasseur et al., 2014). According to the principle of allocation (Cody, 1966), organisms living in environments with more variable temperatures have higher metabolic costs than those living in stable environments. Due to the metabolic costs of acclimation, individual traits such as reproductive success and longevity may decrease. For example, Kingsolver et al. (2013) showed that higher thermal variation in summer, and subsequent heat stresses, might annihilate the benefit of warmer temperatures to the fitness of ectotherms. Similarly, Raglans and Kingsolver (2008) showed that the development time and pupal mass of the pitcher plant mosquito, *Wyeomyia smithii* was negatively affected by large fluctuations close to the thermal optimum of the species.

This study focused on *Monochamus galloprovincialis* Olivier (Coleoptera: Cerambycidae). This species is a source of growing concern because of its role as main vector of the invasive pine wood nematode (PWN), *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner and Buher) Nickle, in Europe (Sousa et al., 2001). In every region where the PWN has been introduced, it is responsible of massive tree mortalities on local pine species (Soliman et al., 2012; Togashi and Shigesada, 2006) providing that mean temperatures in summer are above 20°C (Pérez et al., 2008). In its native North American range, the local pine species such as

Pinus taeda are resistant (Futai, 2013). However the incidence of pine wilt disease on exotic, European pine species, such as *Pinus sylvestris* and *P. nigra*, is also increasing, particularly following periods of drought and high summer temperatures (James et al., 2006), i.e. events that are likely to be more frequent with global warming. It is therefore of great importance to know more about the consequences of temperature change on life traits of *M. galloprovincialis* in order to better predict the spread of PWN.

In this study, we compared the survival and weight gain of adult *M. galloprovincialis* between three climatic conditions: one, hereafter named as “Natural”, corresponding to current, outdoor fluctuating thermal conditions and two experimental conditions with controlled mean and variance of temperature. One experimental modality had the same mean temperature as the natural modality but higher variance. The second experimental modality had the same variance as the first experimental modality but with lower mean temperature. We focused on weight gained during the first 20 days of adult life as it has been shown to improve the flight performances of immature beetles (David et al., 2014), those which are responsible for most of PWN transmission, during their maturation feeding (Naves et al., 2007).

3. Materials and Methods

3.1. *Insect material*

Adult beetles were obtained from fresh dead wood of maritime pine *Pinus pinaster* Aiton, collected from three pure stands located close together in Cestas, southwestern France (44° 44' 43" N; 0° 40' 52" W, 33 m elevation), in January and February 2012. Logs were stored in a climatic chamber until the beetles emerged (temperature $21 \pm 1^\circ\text{C}$ and L:D 16:8). Newly emerged adult insects were collected daily, marked individually with white spots on the elytra, and weighed to the nearest 1 μg with a precision balance (Mettler Toledo, Semi-Micro MS205DU). This initial weight was defined as the weight at emergence (W_0). We also recorded the sex of each beetle. Beetles were then reared in plastic boxes ($35 \times 45 \times 24$ cm), with a number of 6 beetles per box. All the beetles in a given box were of the same sex to avoid mating. Boxes were split between the three climatic modalities (see below). Beetles were supplied *ad libitum* with fresh maritime pine shoots twice a week until they died. In total, we used 72 individuals of *M. galloprovincialis*, 12 males and 12 females in each modality.

3.2. *Set up of the climatic modalities*

To test the effect of temperature regime on beetles' performances, three experimental modalities were used.

The first modality, "Natural", corresponded to natural temperature conditions occurring in 2012, from June 2 to December 6. The rearing boxes were left outside of the laboratory under the shade with a rain protection. A control box of similar size was used to record temperatures on a hourly basis using a HOBO ® data logger (U23-002; Onset Computer Corp., Cape Cod, Massachusetts).

Besides, two controlled experimental modalities were set up in climatic chambers. The first one, "Controlled", was set up so that temperature was fluctuating between the average minimum and maximum temperatures recorded each month in Cestas (France) from 2007 to 2011. The second modality, "Controlled + 2.5° C", was set up using the same temperature regime as in "Controlled" but increased by 2.5°C (*i.e.* fluctuating between average minimum temperature + 2.5°C and average maximum temperature + 2.5 °C), in order to mimic the A1B scenario of IPCC (Solomon, 2007). In the two climatic chambers, temperature was regulated by a software program so as to increase gradually, by one hour step, from the minimum to the maximum value during the first 12h, and then symmetrically decrease during the following 12 hours. In addition, the photoperiod was controlled so as to reproduce the monthly duration of daylight recorded in Cestas. Light spectrum was similar in the two modalities (2 neon lights with natural spectrum and 4 neon lights Grolux®).

3.3. *Survivorship of beetles*

At emergence all insects were randomly affected to one of the three modalities. However, the 72 beetles used in this experiment did not emerge in the same day but between May 25 and June 12, 2012. The date of emergence was therefore included in the statistical models as a covariate. The status (dead or alive) of each beetle was checked twice a week from emergence until the death of the last individual on 7 December 2012.

3.4. Weight gain of beetles

The fresh weight of each beetle was measured twice a week from emergence until death. We used the fresh weight (g) of individual beetle at date i (W_i) and its weight at emergence (W_0) in statistical models to estimate the effect of thermal conditions on weight gain.

3.5. Statistical analysis

Characterisation of the different climatic conditions

To compare the daily mean and daily range of temperatures between the three climatic conditions, a Kruskal-Wallis rank sum test was used followed by pair-wise comparisons using Wilcoxon rank sum tests.

Effect of different climatic conditions on the survivorship

To test the effect of different climatic conditions on the survivorship of *M. galloprovincialis*, survival analyses were performed using Kaplan-Meier estimates. We applied a parametric model using the *survreg* function of the R package *survival* (Therneau, 2013). This model assumed a non-constant hazard with a Weibull distribution of errors, which assumes an increasing risk of death with increasing age of beetles. Beetle sex, weight at emergence and date of emergence were used as covariables.

Effect of different climatic conditions on the weight of adult beetles

Because each individual beetle was weighted several times during their lifetime, weight data were temporally correlated. Linear mixed effect models were therefore applied with the temporal replication of measures in the same individual (Pinheiro and Bates, 2000) to test for the effect of different climatic conditions on weight gain. We used the *lmer* function of the R package *lme4* (Bates et al., 2012). We performed two models, the first was applied to the entire lifespan of the beetles and the second was focused on the 15 first days after emergence which correspond to the maturation period (Chap II). In these models, sex, date of birth, weight at emergence (W_0), log-transformed age (number of days since emergence), climatic conditions and their interactions were set as fixed effects. In all models, we used the weight at emergence (W_0) as covariable to take into account differences in beetle size (Raubenheimer, 1995). The inclusion of log-transformed age improved AIC values (for the total lifespan: with

transformation:-5102, without: - 4608; .for the maturation period: with transformation:-780, without:-773).

4. Results

4.1. *Characterisation of the three climatic modalities*

Significant differences in mean of daily temperatures and daily range of temperatures were observed between modalities (respectively: $X^2 = 37.8$; $P = 6.3 \times 10^{-9}$ and $X^2 = 266.8$; $P < 2.2 \times 10^{-16}$, Table 1).

Surprisingly, the mean of daily temperatures of 2012 under "Natural" conditions were warmer than expected, being not significantly different from those predicted under the +2.5°C IPCC scenario, i.e. "controlled + 2.5°C" (Table 1, Fig 1). Daily mean temperatures were significantly lower in the "Controlled" modality than in the two other modalities ($P < 0.005$).

Daily range of temperatures was significantly lower in the "Natural" modality compared to the others ($P < 0.005$) which had equal variance (Table 1). By contrast, annual range of temperatures was ca. twice as large in the "Natural" conditions than in the two "Controlled" conditions (Table 1) with more extreme minimum and maximum temperatures (Table 1, Fig.1).

Although not consistent with the *a priori* experimental set up, the realized temperature regimes still allowed to independently test for the effect of temperature mean and variance on beetles performances.

Table1: Summary of daily temperatures (°C) for each modality (n=188 days per treatment).

Modality	Minimum	Maximum	Mean *	Annual range §	Daily range #
Natural	-4.40	32.61	17.35 a	5.58	8.23 b
Controlled	2.93	27.90	15.45 b	3.27	21.21 a
Controlled + 2.5 °C	3.87	30.56	17.66 a	3.29	20.75 a

* Mean across year of mean daily temperature;

§ Standard deviation of mean daily temperature across year (between day variation);

Mean across year of standard deviation in daily temperature (within day variation).

The different letters represent significant difference between modalities with $P < 0.005$

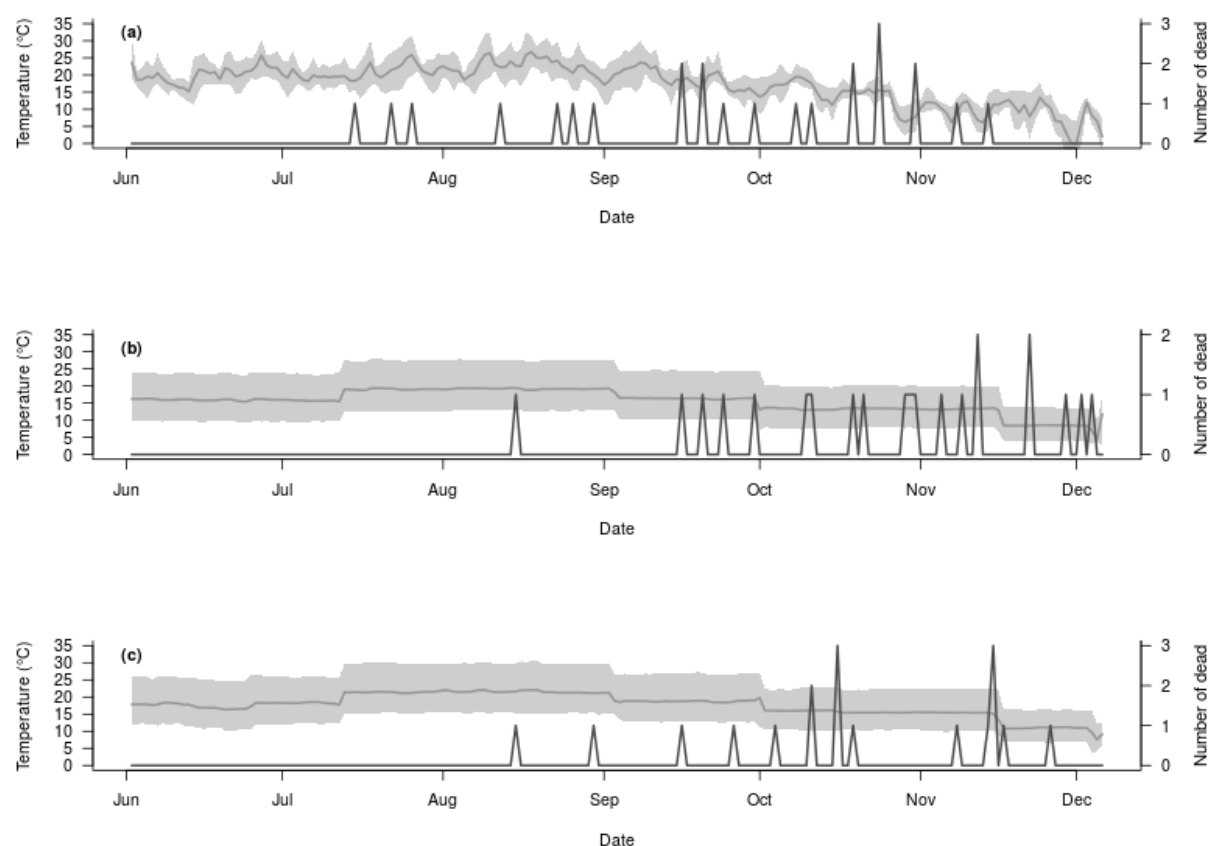


Fig 1 Temperature variation between different climatic conditions during the survival experiment: **a)** "Natural" modality; **b)** "Controlled" modality ; **c)** "Controlled + 2.5° C" modality .Grey lines correspond to the daily mean temperature and shaded areas correspond to the daily range of temperatures. Black lines at the bottom of each graph indicate the number of dead beetles at each date of assessment.

4.2. Effect of different climatic conditions on the survivorship of adult beetles

The three tested climatic conditions had significantly different effects on the survivorship of *M. galloprovincialis* ($X^2 = 19.8$; $P = 5.10^{-5}$) (Fig 2). Insects living under "natural" conditions died significantly sooner than insects reared under the two controlled modalities (Controlled: $z = 3.9$, $P = 7.7 \times 10^{-5}$; Controlled + 2.5 °C: $z = 4.5$, $P = 1.3 \times 10^{-6}$). Survivorship did not significantly differ between the two controlled modalities (with "Controlled" as reference; $z = 0.7$, $P > 0.05$). The model predicted a mean longevity of 126 ± 1 , 160 ± 1 and 168 ± 1 days for the "Natural", "Controlled" and "Controlled + 2.5 °C" modalities respectively.

Sex, weight at emergence and date of emergence had no effect on survivorship (respectively: $X^2 = 2.1$; $P > 0.05$; $X^2 = 0.01$; $P > 0.05$; $X^2 = 0.1$; $P > 0.05$)

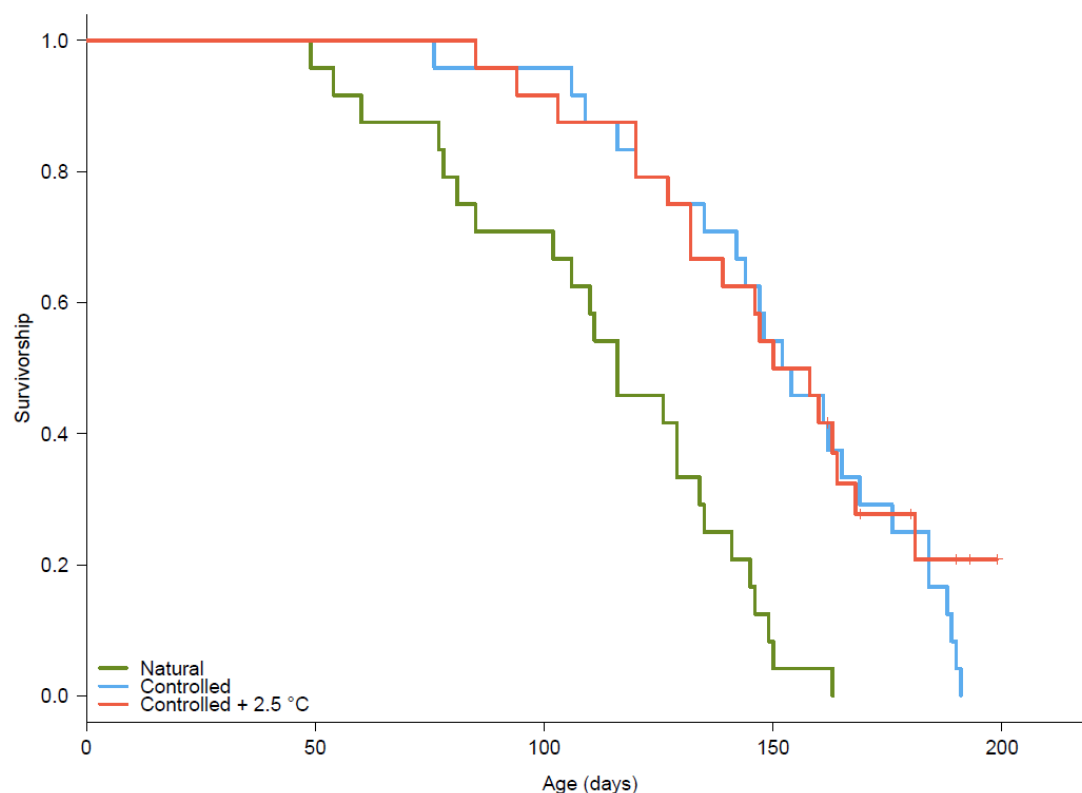


Fig 2 Kaplan-Meier curves of survivorship probability for *Monochamus galloprovincialis* adults under different climatic conditions. Cross marks correspond to censored individuals *i.e.* those which survived the experiment.

4.3. Effect of climatic conditions on weight gain

During the entire lifespan

No significant difference in weight gain was observed between the three climatic modalities. However the interaction between sex and age had a significant effect ($F_{df=1} = 34.4$, $P < 0.001$). The females gained more weight with age than did males (respectively, $t_{df=340} = 24.4$, $P < 0.001$; $t_{df=280} = 15.9$, $P < 0.001$). For all beetles, the weight gain mainly took place during the first 30 days of the lifetime.(Fig.1S)

During the maturation period

As for the entire lifespan, no significant difference was observed between the three climatic modalities (Fig.3), and no difference between sexes were observed neither ($F_{df=1} = 0.54$; $P > 0.05$). Only age had a significant positive effect ($F_{df=1} = 185$, $P < 0.005$).

In both models (entire lifespan and maturation period), the date of emergence had no significant effect ($F_{df=21} = 1.6$, $P > 0.05$; $F_{df=21} = 1$, $P > 0.05$ respectively)

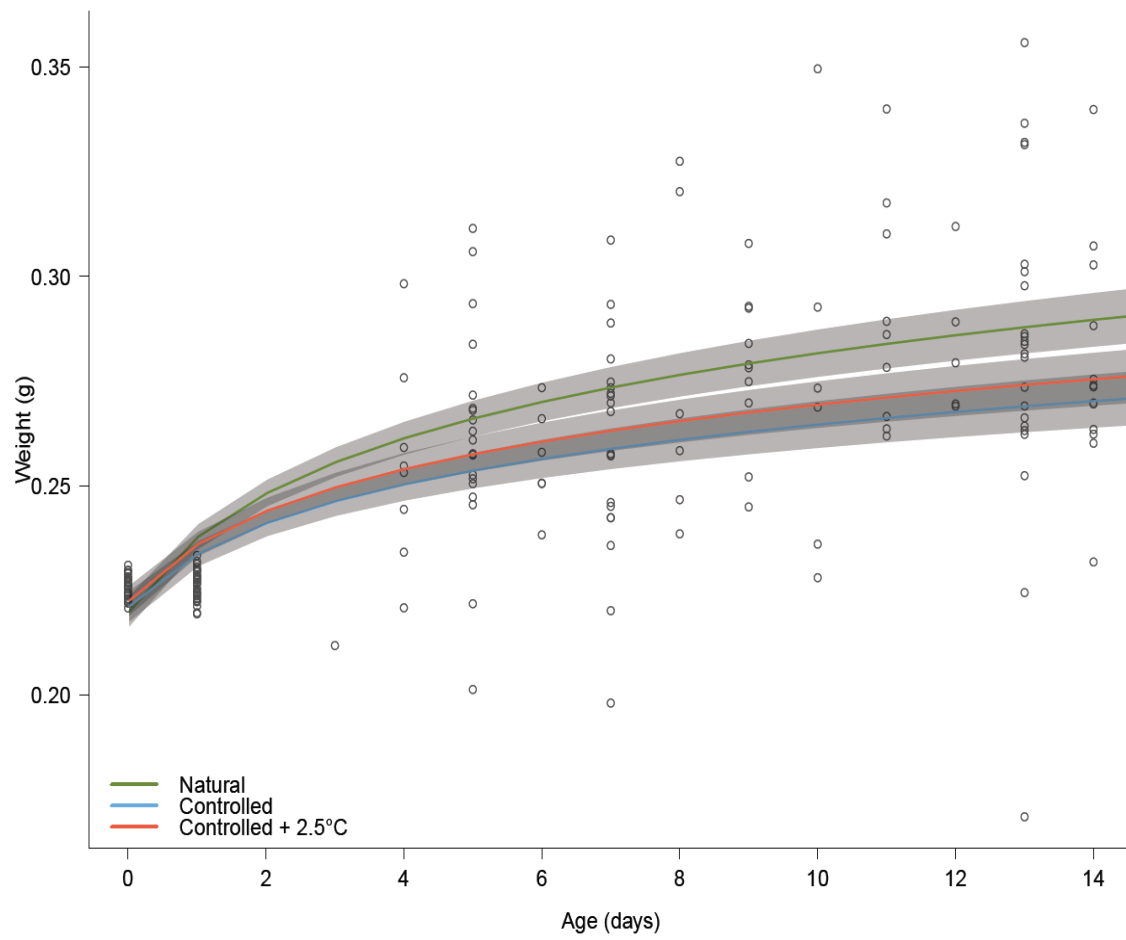


Fig.3 Effect of age on weight gain in adult *Monochamus galloprovincialis*, under three temperature regimes, during the maturation period. The lines correspond to the model predict and the shaded areas indicate the standard error.

5. Discussion

A previous study estimated adult longevity of *M. galloprovincialis* as 61.2 ± 6.5 days for males and 64.0 ± 6.3 days for females, respectively, when reared under controlled conditions, i.e., constant temperature of 25°C, 70–75% RH and 12 : 12 L:D (P. Naves et al., 2006). Here, under natural conditions with ca. 17°C of average temperature, we observed a mean longevity of 126 ± 1 days. This is the longest life-span ever recorded for *M. galloprovincialis* (Akbulut and Stamps, 2012). There are the three main hypotheses explaining the differences between our observed longevity and results from previous study. First, the mean temperature in our experiment was lower than the one used in the study of Naves et al. (2006) which may have been above the optimum threshold of development. Second, it has been shown that deleterious effects of high temperatures could be recovered by daily return to a moderate temperature (Petavy et al., 2001). The study of Naves et al (2006) was conducted under constant temperature conditions while our experiment involved diurnally fluctuating temperature cycles, allowing beetles to recover, i.e. be less active and save energy, during the night when temperature was lower. Third, Portuguese and French populations of *M. galloprovincialis* could be genetically distinct, exhibiting different life trait values, like different lifespans. For example it has been shown that *M. carolinensis* present 0.5 to 2 generations per year depending on the climatic conditions of the region where populations make their life cycle (Akbulut and Stamps, 2012).

We found no difference in longevity between males and females. (Ellers and Van Alphen, 1997) observed a lower lifespan in females of *Asobara tabida*, which they explained by a trade-off between survival and reproduction, since females had to allocate a large amount of energy to oogenesis. In our experiments males and females were kept separated, precluding reproduction and then oogenesis in females, which could explain the lack of difference in longevity between the two sexes.

Using similar fluctuating temperature cycles ("controlled" modalities), which are probably more biologically relevant than constant temperatures, we showed that an increase of 2.5°C in average temperature had no effect on adult survivorship in *M. galloprovincialis*. Contrary to expectation, because increasing temperature is known to enhance metabolic activities in ectothermic organisms (Chown et al., 2010), we did not observed significantly higher weight gain in the "Controlled + 2.5 °C" modality even during the maturation period. This could be

due to i) a too small difference in mean temperatures between the two modalities to allow detecting a significant effect or ii) a non linear performance response to increasing temperatures, 15.5°C and 17.5°C being close to the optimal temperature threshold (and 25°C tested in Naves et al. 2006 above this threshold). Further investigation using a wider range of mean temperatures would help to test these hypotheses.

By contrast, mean temperatures being equal, the regime with higher annual range of temperatures ("Natural") resulted in significantly lower longevity than the regime with lower range ("Controlled") which confirms our initial hypothesis that temporal variability of average temperature can negatively affect insect performances. We also tested the daily range of temperature which corresponds to a variability within days but this time, the larger ranges (observed in the two controlled conditions) did not have any negative effect on performances.

These findings are consistent with previous studies. For example, Terblanche et al. (2010) showed that higher mean temperatures associated with greater temperature variability had stronger negative effects on the fitness of *Ceratitis capitata* than elevated mean temperatures alone. The fitness of *Drosophila melanogaster* was also negatively affected by large temperature variance and extreme weather conditions (Hoffmann, 2010). Higher thermal variability increases the level of stress (Vasseur et al., 2014) and the metabolic cost of acclimation, which can have detrimental effects on physiological processes like reproduction and longevity. For example, Marshall and Sinclair (2011) showed that fluctuating temperature regimes drove trade-offs between immediate survival and future reproduction in *Drosophila melanogaster*. Terblanche et al. (2010) also demonstrated that fluctuating temperatures could affect physiological tolerance and resistance to extreme climatic events in unpredictable ways.

In conclusion, an increase of 2.5 °C has no effect on the performances of adult *M. galloprovincialis* but large between days thermal fluctuations seem to reduce adult longevity. This confirms the interest of manipulating temperature variations during experiments addressing the effects of global warming on ectotherms.

Our findings may have important implications for managing the spread of PWN vectored by adult *Monochamus* in European forests. Inoculation of pinewood nematodes mainly occurs during the maturation feeding of beetles on healthy trees but further inoculations are also observed later during egg-laying of mature females on weakened trees (Akbulut and

Stamps, 2012). To move from tree to tree, *M. galloprovincialis* mainly flies and the flight capacity of this insect is not decreasing with age (David et al., 2014). So the only limitation for beetle's dispersal, and by consequence for nematode's spread, is the insect's lifespan. Here we showed that adult *M. galloprovincialis* can live up to four months in natural conditions. In a flight mill experiment, we estimated that the daily performance of the beetle was ca. 1 km (David et al., 2014). This suggests that the insect vector of the PWN could fly more than 100 km during its entire lifespan. Insect flight activity occurs above a lower temperature threshold and then global warming might result in increasing daily frequency of flights (Taylor, 1963). If climate change also translates into less variable summer temperatures, the number of days beetles can survive and fly might also increase, leading to overall higher risk of nematode transmission.

6. Acknowledgements

We are grateful to Fabrice Vetillard for his help with the management of climatic chambers and the feeding of beetles. G.D. was supported by a grant from French Ministry of Agriculture, Food and Forestry. This study was financed through a grant by the European Union Seventh Framework Programme FP7 via the Project REPHRAME (grant agreement 265483).

7. Supplementary material

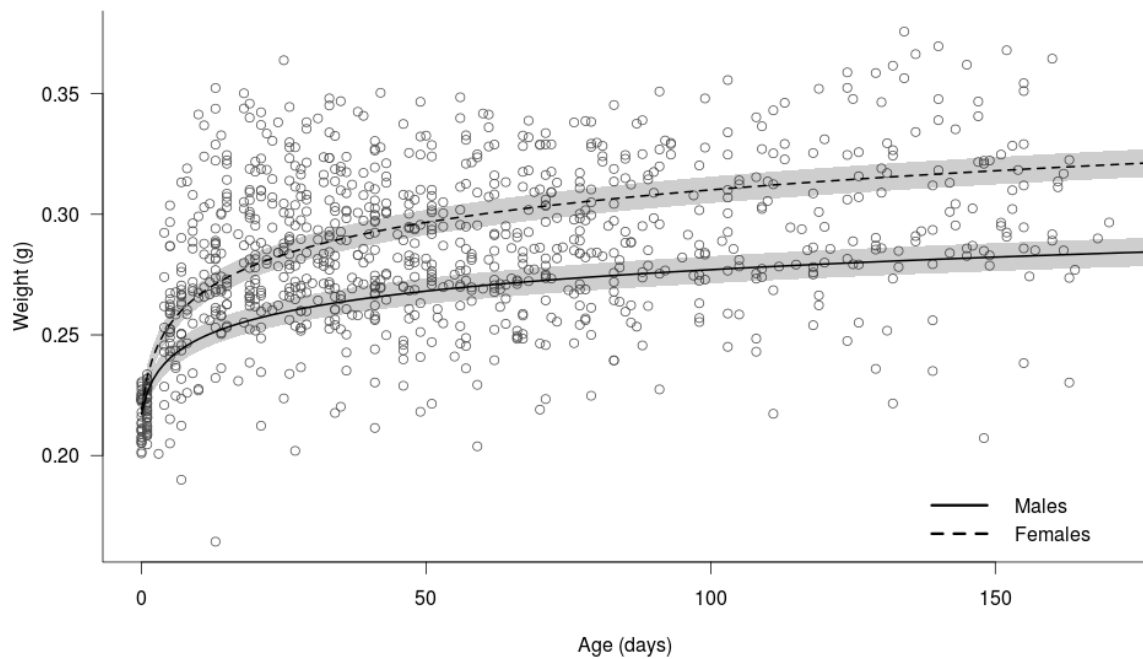


Fig 1S Effect of age on weight gain in both sexes of *Monochamus galloprovincialis* adults ($F_{df=1} = 34.40$; $P < 0.001$). The lines correspond to the model predict and the shaded areas indicate the standard error. For males, $\text{Weight} = 1.6 \times 10^{-2} \times \text{Log}(\text{Age}+1) + 2.3 \times 10^{-1}$ ($t_{df=280} = 15.9$; $P < 0.001$) For females, $\text{Weight} = 2.4 \times 10^{-2} \times \text{Log}(\text{Age}+1) + 2.3 \times 10^{-1}$ ($t_{df=340} = 24.4$; $P < 0.001$)

8. References

- Akbulut, S., Stamps, W.T., 2012. Insect vectors of the pinewood nematode: a review of the biology and ecology of *Monochamus* species. *For. Pathol.* 42, 89–99. doi:10.1111/j.1439-0329.2011.00733.x
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., 2012. lme4: Linear mixed-effects models using S4 classes.
- Bozinovic, F., Bastías, D.A., Boher, F., Clavijo-Baquet, S., Estay, S.A., Angilletta, M.J., 2011. The Mean and Variance of Environmental Temperature Interact to Determine Physiological Tolerance and Fitness. *Physiol. Biochem. Zool.* 84, 543–552. doi:10.1086/662551
- Chown, S.L., Hoffmann, A.A., Kristensen, T.N., Angilletta Jr, M.J., Stenseth, N.C., Pertoldi, C., 2010. Adapting to climate change: a perspective from evolutionary physiology. *Clim. Res. Open Access Artic.* 4 Years Old Older 43, 3.
- Cody, M.L., 1966. A general theory of clutch size. *Evolution* 20, 174–184. doi:10.2307/2406571
- David, G., Giffard, B., Piou, D., Jactel, H., 2014. Dispersal capacity of *Monochamus galloprovincialis*, the European vector of the pine wood nematode, on flight mills. *J. Appl. Entomol.* 138, 566–576. doi:10.1111/jen.12110
- Deutsch, C.A., Tewksbury, J.J., Huey, R.B., Sheldon, K.S., Ghalambor, C.K., Haak, D.C., Martin, P.R., 2008. Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 6668–6672. doi:10.1073/pnas.0709472105
- Ellers, J., Van Alphen, J.J.M., 1997. Life history evolution in *Asobara tabida*: plasticity in allocation of fat reserves to survival and reproduction. *J. Evol. Biol.* 10, 771–785. doi:10.1046/j.1420-9101.1997.10050771.x
- Estay, S.A., Clavijo-Baquet, S., Lima, M., Bozinovic, F., 2011. Beyond average: an experimental test of temperature variability on the population dynamics of *Tribolium confusum*. *Popul. Ecol.* 53, 53–58. doi:10.1007/s10144-010-0216-7

- Futai, K., 2013. Pine Wood Nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51, 61–83. doi:10.1146/annurev-phyto-081211-172910
- Hansen, J., Sato, M., Ruedy, R., Lo, K., Lea, D.W., Medina-Elizade, M., 2006. Global temperature change. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 14288–14293. doi:10.1073/pnas.0606291103
- Hoffmann, A.A., 2010. Physiological climatic limits in *Drosophila*: patterns and implications. *J. Exp. Biol.* 213, 870–880.
- Hoffmann, A.A., Anderson, A., Hallas, R., 2002. Opposing clines for high and low temperature resistance in *Drosophila melanogaster*. *Ecol. Lett.* 5, 614–618. doi:10.1046/j.1461-0248.2002.00367.x
- James, R., Tisserat, N., Todd, T., 2006. Prevention of pine wilt of scots pine (*Pinus sylvestris*) with systemic abamectin injections. *Arboric. URBAN For.* 32, 195.
- Kingsolver, J.G., Diamond, S.E., Buckley, L.B., 2013. Heat stress and the fitness consequences of climate change for terrestrial ectotherms. *Funct. Ecol.* 27, 1415–1423. doi:10.1111/1365-2435.12145
- Kingsolver, J.G., Ragland, G.J., Diamond, S.E., 2009. Evolution in a constant environment: thermal fluctuations and thermal sensitivity of laboratory and field populations of *Manduca sexta*. *Evol. Int. J. Org. Evol.* 63, 537–541. doi:10.1111/j.1558-5646.2008.00568.x
- Lavergne, S., Mouquet, N., Thuiller, W., Ronce, O., 2010. Biodiversity and Climate Change: Integrating Evolutionary and Ecological Responses of Species and Communities. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 41, 321–350. doi:10.1146/annurev-ecolsys-102209-144628
- Marshall, K.E., Sinclair, B.J., 2011. The sub-lethal effects of repeated freezing in the woolly bear caterpillar *Pyrrharctia isabella*. *J. Exp. Biol.* 214, 1205–1212. doi:10.1242/jeb.054569
- Morris, W.F., Pfister, C.A., Tuljapurkar, S., Haridas, C.V., Boggs, C.L., Boyce, M.S., Bruna, E.M., Church, D.R., Coulson, T., Doak, D.F., Forsyth, S., Gaillard, J.-M., Horvitz,

- C.C., Kalisz, S., Kendall, B.E., Knight, T.M., Lee, C.T., Menges, E.S., 2008. Longevity can buffer plant and animal populations against changing climatic variability. *Ecology* 89, 19–25. doi:10.1890/07-0774.1
- Naves, Camacho, S., De Sousa, E.M., Quartau, J.A., 2007. Transmission of the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* through feeding activity of *Monochamus galloprovincialis* (Col., Cerambycidae). *J. Appl. Entomol.* 131, 21–25. doi:10.1111/j.1439-0418.2006.01111.x
- Naves, P., de Sousa, E., Quartau, J. a., 2006. Reproductive traits of *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera: Cerambycidae) under laboratory conditions. *Bull. Entomol. Res.* 96, 289–294. doi:10.1079/BER2006422
- Paaijmans, K.P., Heinig, R.L., Seliga, R.A., Blanford, J.I., Blanford, S., Murdock, C.C., Thomas, M.B., 2013. Temperature variation makes ectotherms more sensitive to climate change. *Glob. Change Biol.* 19, 2373–2380. doi:10.1111/gcb.12240
- Parmesan, C., Yohe, G., 2003. A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature* 421, 37–42. doi:10.1038/nature01286
- Pérez, G., Díez, J.J., Ibeas, F., Pajares, J.A., 2008. Assessing pine wilt disease risk under a climate change scenario in Northwestern Spain, in: *Managing Forest Ecosystems: The Challenge of Climate Change*. Springer, pp. 269–282.
- Petavy, G., David, J.R., Gibert, P., Moreteau, B., 2001. Viability and rate of development at different temperatures in *Drosophila*: a comparison of constant and alternating thermal regimes. *J. Therm. Biol.* 26, 29–39. doi:10.1016/S0306-4565(00)00022-X
- Pinheiro, J.C., Bates, D.M., 2000. *Mixed-effects models in S and S-PLUS*. Springer.
- Ragland, G.J., Kingsolver, J.G., 2008. The effect of fluctuating temperatures on ectotherm life-history traits: comparisons among geographic populations of *Wyeomyia smithii*. *Evol. Ecol. Res.* 10, 29.
- Raubenheimer, D., 1995. Problems with Ratio Analysis in Nutritional Studies. *Funct. Ecol.* 9, 21. doi:10.2307/2390086

- Ruel, J.J., Ayres, M.P., 1999. Jensen's inequality predicts effects of environmental variation. *Trends Ecol. Evol.* 14, 361–366. doi:10.1016/S0169-5347(99)01664-X
- Soliman, T., Mourits, M.C.M., van der Werf, W., Hengeveld, G.M., Robinet, C., Lansink, A.G.J.M.O., 2012. Framework for Modelling Economic Impacts of Invasive Species, Applied to Pine Wood Nematode in Europe. *PLoS ONE* 7, e45505. doi:10.1371/journal.pone.0045505
- Solomon, S., 2007. Climate change 2007-the physical science basis: Working group I contribution to the fourth assessment report of the IPCC. Cambridge University Press.
- Sousa, E., Bonifácio, L., Pires, J., Penas, A.C., Mota, M., Bravo, M.A., Naves, P., 2001. *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda; Aphelenchoididae) associated with *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera; Cerambycidae) in Portugal. *Nematology* 3, 89–91. doi:10.1163/156854101300106937
- Taylor, L.R., 1963. Analysis of the effect of temperature on insects in flight. *J. Anim. Ecol.* 99–117.
- Terblanche, J.S., Nyamukondiwa, C., Kleynhans, E., 2010. Thermal variability alters climatic stress resistance and plastic responses in a globally invasive pest, the Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*). *Entomol. Exp. Appl.* 137, 304–315. doi:10.1111/j.1570-7458.2010.01067.x
- Thompson, R.M., Beardall, J., Beringer, J., Grace, M., Sardina, P., 2013. Means and extremes: building variability into community-level climate change experiments. *Ecol. Lett.* 16, 799–806. doi:10.1111/ele.12095
- Togashi, K., Shigesada, N., 2006. Spread of the pinewood nematode vectored by the Japanese pine sawyer: modeling and analytical approaches. *Popul. Ecol.* 48, 271–283. doi:10.1007/s10144-006-0011-7
- Vasseur, D.A., DeLong, J.P., Gilbert, B., Greig, H.S., Harley, C.D.G., McCann, K.S., Savage, V., Tunney, T.D., O'Connor, M.I., 2014. Increased temperature variation poses a greater risk to species than climate warming. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 281, 20132612. doi:10.1098/rspb.2013.2612

Wang, X.-G., Johnson, M.W., Daane, K.M., Nadel, H., 2009. High Summer Temperatures Affect the Survival and Reproduction of Olive Fruit Fly (Diptera: Tephritidae). *Environ. Entomol.* 38, 1496–1504. doi:10.1603/022.038.0518

Chapitre V

Discussion générale et perspectives

1. Choix méthodologiques

La majorité de ce travail de thèse a été consacré à l'étude des capacités et du comportement de dispersion de *Monochamus galloprovincialis*. Pour cela, nous avons fait le choix d'utiliser un manège de vol.

Il existe actuellement un certain nombre de méthodes pour étudier les performances de dispersion des insectes qui présentent chacune des avantages et des inconvénients. La méthode la plus utilisée est sûrement celles des CMR, captures-marquage-recaptures (Ranius and Hedin, 2001; Togashi, 1990b). Elle permet d'obtenir une information directe sur la dispersion réalisée par les individus marqués en conditions naturelles. Cependant, cette méthode sous-estime les capacités de dispersion car elle ne tient pas compte des insectes qui volent au-delà de la zone d'étude, là où les pièges sont absents. Elle ignore également les distances parcourues par les individus qui se sont dispersés avant la première capture. De plus, certains insectes comme les scolytes (Jactel et al. 1991) ou *M. galloprovincialis* (Ibeas et al., 2007) sont difficiles à piéger lorsqu'ils sont immatures car ils ne répondent pas à l'attraction des phéromones. La seule autre méthode permettant une observation directe sur le terrain est le radiopistage qui consiste à poser un radio-émetteur sur l'insecte et ensuite à suivre son parcours grâce à un récepteur (Hedin and Ranius, 2002). Le principal inconvénient de cette technique est le poids des transmetteurs, ce qui limite leur utilisation aux gros insectes, dont ne fait pas partie *M. galloprovincialis*. Le poids du plus petit dispositif actuellement en vente est de 0.2g et le plus gros individu que nous avons mesuré lors de ce travail pesait 0.6 g. Cependant, contrairement aux lâchers-recaptures, le radiopistage permet de détecter des événements de dispersion dans des habitats inattendus ou hors de la zone d'études. Elle permet également d'enregistrer l'ensemble des distances parcourues par les insectes fournissant ainsi une information plus complète (Ranius, 2006).

Une autre méthode, celle-ci indirecte, permet d'estimer les capacités de dispersion des insectes : c'est le manège de vol. Contrairement aux précédentes, les mesures sur manège de vol sont réalisées en conditions contrôlées. Elles ne fournissent donc pas une information sur le comportement de vol réalisé en conditions naturelles des insectes mais plutôt une information sur leurs capacités potentielles. Les manèges présentent plusieurs avantages : ils fournissent une estimation de la proportion de volants ainsi que des capacités précises de l'espèce étudiée (sous la forme d'une distribution de fréquences des distances parcourues,

Fig.1 Chap. III) . Ils permettent surtout de détecter des différences entre individus de sexes ou de statuts physiologiques différents (Hughes and Dorn, 2002), par exemple matures ou immatures.

Les méthodes de terrain permettent donc d'obtenir une information sur le comportement de dispersion mais sous-estiment les capacités de déplacement tandis que les expériences de laboratoire ont tendance à surestimer les capacités de vol mais fournissent une information sur le potentiel de dispersion en fonction de différents facteurs endogènes. Ces techniques apparaissent donc comme complémentaires. Cependant, comme les manèges de vol permettent de mieux tester les hypothèses physiologiques pouvant expliquer les performances de vol des insectes, nous les avons privilégiés.

2. Résumé des principaux résultats

2.1. *Quel type de comportement de dispersion pour *Monochamus galloprovincialis* ?*

Les *Monochamus* étant souvent considérés comme des insectes avec des capacités de vol assez faibles (Akbulut and Stamps, 2012), nous avons fait l'hypothèse que la dispersion de *M. galloprovincialis* était principalement due à une activité de recherche de ressources et donc à des mouvements de routine, avec une faible proportion de déplacements à longue distance.

Dans le chapitre III, nous avons montré que plus de 50 % des vols unitaires sont de moins de 800 m alors que la distance maximale enregistrée est dix fois plus importante (8.54 km). Ces résultats semblent donc valider notre hypothèse. De plus, nous n'avons constaté aucun effet de l'âge sur la distance parcourue lors des sessions hebdomadaires (Chap. III, Tableau 3). Les *M. galloprovincialis* matures conservent donc une capacité de vol équivalente tout au long de leur vie, ce qui semble également être cohérent avec une dispersion principalement vouée à une activité de recherche de ressources alimentaires ou de substrat de ponte tout au long de la vie des insectes, et ce d'autant plus que cette vie est longue (ca. 126 jours, Chap.IV) .

A la différence des mouvements courts de routine, et même des mouvements directs occasionnels à plus longue distance, les mouvements particuliers à très longue distance,

comme ceux accomplis lors des migrations, engagent des coûts énergétiques très importants. Les migrations correspondent à un déplacement de masse, souvent direct, sur de grandes distances, d'un grand nombre d'individus d'un endroit à un autre (Begon et al., 2009). Elles permettent de coloniser de nouveaux territoires plus riches en ressources. En accord avec l'« oogenesis flight syndrome », ces mouvements très longs se font au détriment d'autres fonctions biologiques comme la reproduction (Zera, 2005) et n'ont généralement pas lieu au même moment. Par exemple, chez les grillons *Gryllus bimaculatus* (Lorenz, 2007), les performances de vol maximales sont atteintes deux jours après l'émergence puis diminuent avec l'augmentation du nombre d'œufs chez les femelles. Chez *M. galloprovincialis*, nous avons constaté une augmentation de la distance parcourue avec l'âge chez les immatures, c'est-à-dire au cours des 20 premiers jours de la vie adulte (Chap. II, Tableau 1). Par ailleurs, pour les insectes matures, nous avons constaté une modification du comportement de dispersion avec l'âge des individus (Chap. III). Même si la distance parcourue reste la même au sein des sessions de deux heures, le nombre de vols diminue au cours du temps et la distance moyenne volée par vol unitaire augmente. Ce phénomène peut correspondre à une augmentation de la masse musculaire mobilisable pour le vol à mesure que les insectes gagnent en poids (chapitre IV), mais peut également être lié à une modification de la ressource recherchée. En effet, au début de leur vie adulte, les *Monochamus* immatures recherchent des arbres sains pour faire leur repas de maturation sur les pousses vertes. Cette ressource est facile à trouver dans une forêt de plantation comme la forêt des Landes de Gascogne, constituée à 85% de pins maritimes. Elle ne demande donc que des vols à courtes distances pour passer d'un arbre à l'autre. Par contre, après la période de maturation, Ibeas et al., (2007) et Pajares et al. (2004) ont montré que ces insectes devenaient sensibles à des volatiles émis par des arbres affaiblis ainsi qu'aux phéromones de scolytes également révélateurs d'arbres dépérissants, représentant autant de sites de ponte potentiels pour les femelles. Ces arbres affaiblis ou morts représentent une ressource moins abondante et donc plus dispersée que la première (arbres sains avec pousses vertes), nécessitant des vols plus longs pour améliorer la capacité de prospection.

2.2. Quelle stratégie d'allocation d'énergie pour *Monochamus galloprovincialis* ?

M. galloprovincialis est un insecte longévif, les adultes présentent une durée de vie de plusieurs mois, 126 ± 1 jours (soit environ 4 mois) dans notre modalité « Natural », (Chap. IV)

contre 63 ± 6 jours (environ 2 mois) au Portugal (P. Naves et al., 2006). D'après Stevens et al. (2000) les insectes avec une longue durée de vie ont tendance, à l'émergence, à investir leur énergie dans le développement d'un corps robuste et plus particulièrement dans le thorax plutôt que dans la reproduction. Nous avons donc fait l'hypothèse que *M. galloprovincialis* devait être synovogénique (c'est-à-dire ne pas présenter d'œufs à l'émergence) (Jervis et al., 2005) et investir dans la dispersion la majorité des ressources acquises lors des stades larvaires tandis que l'investissement dans la reproduction pourrait surtout dépendre des ressources acquises lors de la vie adulte.

Dans le Chapitre II, nous avons démontré que les femelles de *M. galloprovincialis* ne présentaient pas d'œufs à l'émergence. Elles sont donc bien synovogéniques et comme nous n'avons trouvé d'œufs que dans des femelles de plus de 10 jours nous pouvons en déduire que l'investissement dans l'oogénèse dépend surtout de ressources acquises lors de la vie adulte.

Nous avons également montré que les insectes possèdent une bonne capacité de vol dès l'émergence, ce qui indique que l'investissement dans cette fonction est réalisé grâce aux ressources acquises précédemment, aux stades larvaires. Par la suite, nous avons mis en évidence une augmentation de cette capacité de dispersion avec l'âge s'accompagnant d'une augmentation du poids du thorax. Cela peut être expliqué par un développement des muscles de vol mais aussi par une accumulation des réserves nécessaires au vol (Marden, 2000). En effet, Marden (2000) a montré que les insectes ont besoin pour voler d'une masse musculaire représentant 12 à 16 % de leur poids total et que l'augmentation de ce pourcentage s'accompagnait d'une augmentation de leurs performances de vol. Cependant, chez *M. galloprovincialis* la distance parcourue augmente principalement avec l'accumulation de réserves dans le thorax (Chap. II, fig. 6). Il semble donc que la capacité de dispersion soit à la fois dépendante de ressources acquises aux stades larvaires mais aussi de ressources courantes acquises pendant la vie adulte. Selon Boggs (2009), chez les holométaboles, tous les principaux processus physiologiques ont besoin de ressources énergétiques issues de ces deux types de ressources. Comme les différents stades ont des modes d'alimentation et parfois des hôtes différents, ils n'ont pas à disposition les mêmes nutriments. Par exemple, Casas et al., (2005) ont montré que le parasitoïde *E. vuilletti* est « capital breeder » pour les lipides et « income breeder » pour les sucres. C'est à dire que les œufs sont élaborés à partir d'un mélange de lipides acquis aux stades larvaires et de sucres acquis au stade adulte. Une

hypothèse serait donc que pour *M. galloprovincialis*, les nutriments essentiels au développement des muscles alaires ("le moteur") soient plus disponibles dans l'alimentation larvaire (dans le bois) et que l'alimentation au stade adulte (sur jeunes pousses) apporte plus les sucres et les lipides nécessaires pour soutenir le vol ("le carburant").

2.3. Existe-t-il un compromis d'allocation de l'énergie entre la dispersion et la reproduction chez *M. galloprovincialis* ?

Dans des conditions où les ressources ne sont pas limitantes, il ne semble pas exister de compromis entre la capacité de dispersion et l'oogenèse pour *M. galloprovincialis* (Chap. II). Chez cette espèce, l'allocation d'énergie dans ces deux fonctions ne semble pas avoir lieu au même moment. Nous avons vu précédemment que la mise en place des capacités de vol se faisait grâce aux ressources énergétiques acquises aux stades larvaires alors que l'oogenèse semblait dépendre de l'énergie acquise au stade adulte. Néanmoins, une partie de l'énergie acquise à ce stade permet également de fournir le « carburant » permettant de maintenir la capacité de vol. Nous avons montré que la capacité de dispersion de *M. galloprovincialis* résultait principalement de mouvements de routine. Ces mouvements de courte distance ont un coût métabolique plus faible que de réels mouvements de migration. Les mouvements directs à plus longue distance, même s'ils présentent un coût métabolique plus important que les mouvements de routine, semblent être occasionnels et n'impliquer aucun compromis avec la reproduction (Bonte et al., 2012). Au contraire, la recherche alimentaire est essentielle pour les insectes synovogéniques. En effet, cette stratégie leur permet d'adapter leur effort dans la reproduction en fonction de la disponibilité des sites de ponte (Ellers et al., 2000) en investissant préférentiellement dans leur maintenance et leur capacité de recherche de ressources. Ils sont donc obligés de maintenir leur capacité de vol que ce soit pour s'alimenter, assurer l'oogénèse (Fischer et al., 2004) mais aussi pour trouver des sites de ponte (Boggs, 1981).

Notre étude a été réalisée en condition de ressources non limitantes que ce soit au stade larvaire ou au stade adulte. Il pourrait être intéressant d'observer ces patrons d'allocation en limitant l'alimentation disponible aux différents stades et en réalisant un budget énergétique complet pour tous ces stades. Stevens et al. (2000) prédisent que chez les insectes longévifs, lorsque les ressources disponibles au stade larvaire sont limitées, l'investissement privilégié reste dans le thorax, assurant ainsi une bonne capacité de prospection pour combler le

manque de ressource au cours de la vie adulte. Chez *M. galloprovincialis*, une réduction de la disponibilité des ressources au stade larvaire pourrait être due à une dégradation accélérée du bois mort où se développent les larves, comme par exemple à la suite de conditions climatiques défavorables (hiver pluvieux) ou alors à un substrat de ponte inadéquat (pièces de bois mort de petit diamètre avec peu de tissus nourriciers).

Par ailleurs Hanski et al. (2006) ont démontré avec *Melitaea cinxia* que, chez les insectes longévifs qui ne présentent pas de migration au sens strict, l'hypothèse d'un compromis entre dispersion et reproduction n'était sans doute pas pertinente car principalement étudiée chez des insectes avec un dimorphisme alaire (Zera and Denno, 1997). Ils proposent plutôt l'existence d'un compromis d'allocation entre activités métaboliques importantes et durée de vie. Avoir une activité métabolique importante permettrait par exemple de meilleures performances de dispersion et une oviposition plus précoce alors que l'allongement de la durée de vie permettrait d'attendre des conditions plus favorables pour la reproduction. Cependant, les variations intra-spécifiques concernant l'allocation aux fonctions somatiques vs reproductives restent peu explorées (Boggs, 2009). Il serait donc intéressant de mieux étudier les conséquences de ces variations et si cette variation est une réponse à la variabilité de la disponibilité en ressources, par exemple aux stades larvaires.

2.4. Quel sont les effets possibles du réchauffement climatique sur les performances de *M. galloprovincialis* ?

Précédemment, nous avons mis en évidence que les capacités de dispersion de *M. galloprovincialis* restaient constantes tout au long de sa vie. Ce facteur n'étant guère limitant, il apparaît donc que la probabilité d'inoculation du nématode par l'insecte dépend davantage de sa durée de vie. Dans l'introduction de cette thèse nous avons par ailleurs rappelé que le changement climatique pouvait favoriser l'expansion des espèces invasives, notamment via une meilleure survie ou de meilleures performances des espèces introduites (Parmesan and Yohe, 2003). Dans le chapitre IV, nous nous sommes donc intéressés à l'effet de l'augmentation des températures sur la longévité et le gain de poids de *M. galloprovincialis*.

Nous avons émis l'hypothèse d'une augmentation des performances des individus avec l'augmentation des températures moyennes, mais limitée par une augmentation de la variabilité des températures (Vasseur et al., 2014). Nos résultats indiquent qu'une augmentation des températures moyennes de 2,5 °C n'a d'effet ni sur la longévité ni sur le

gain de poids des *Monochamus*. Cependant, nous avons constaté que la fluctuation des températures journalières augmentait la mortalité mais n'avait aucun effet sur le gain de poids.

Il a déjà été montré que les capacités de dispersion des insectes pouvaient augmenter avec le changement climatique, notamment via des fréquences de vols plus importantes. Chez les ectothermes, la plupart des activités, comme le vol, sont en effet dépendantes de la température. Le vol n'a lieu que lorsque la température dépasse une certaine valeur seuil (ex. 20°C pour *M. galloprovincialis*, observation personnelle) et le changement climatique peut augmenter le temps passé au dessus de ce seuil dans les régions où l'insecte est déjà présent (Taylor, 1963).

Le changement climatique est également connu pour avoir un effet significatif sur la fitness des insectes (Hoffmann, 2010). L'augmentation moyenne des températures peut maximiser la reproduction en augmentant l'activité métabolique globale. Cette augmentation de l'activité métabolique peut également accélérer le développement larvaire et ainsi conduire à une augmentation du nombre de générations par an. Par exemple, aux Etats-Unis, *M. carolinensis* peut réaliser 2 générations par an lorsque les conditions climatiques sont favorables (Akbulut and Stamps, 2012). Il est également possible que l'augmentation du rendement métabolique modifie la phénologie des espèces (Schwartzberg et al., 2014). Des émergences précoces de *Monochamus*, pourraient ainsi être observées, permettant notamment d'éviter les fortes températures estivales. Ces effets de la hausse des températures conduisant à plus de générations par an et plus d'individus survivants par génération pourraient avoir de graves conséquences pour l'expansion du nématode du pin en augmentant la durée et la fréquence des évènements d'inoculation par son insecte vecteur.

Le changement climatique peut également permettre aux espèces d'étendre leur aire de distribution en rendant accessible de nouveaux territoires (Hill et al., 2011). Cette expansion peut provoquer l'apparition de nouvelles populations présentant des différences phénotypiques. Hill et al. (2001) ont ainsi montré que les sites nouvellement colonisés par le papillon *Pararge aegeria* présentaient des populations avec des adultes plus grands, avec une masse du thorax plus importante et donc probablement meilleurs voiliers. Le changement climatique peut également avoir un effet sur les compromis d'allocation entre différentes fonctions biologiques. Hughes et al. (2003) ont mis en évidence chez *P. aegeria* que

l'augmentation des capacités de dispersion se faisait au détriment de l'investissement dans la reproduction : les femelles ont un plus grand thorax mais produisent moins d'œufs.

Cependant l'augmentation de la fréquence d'évènements extrêmes peut aussi avoir un effet néfaste sur la fitness des insectes. Par exemple, Terblanche et al. (2010) ont montré qu'une augmentation de la température moyenne associée à une variabilité thermique importante était plus dommageable pour la fitness de *Ceratitis capitata* qu'une augmentation de la température moyenne seule. La fitness de *Drosophila melanogaster* est également négativement affectée par une grande variabilité annuelle de la température ainsi que par les conditions climatiques extrêmes (Hoffmann, 2010). De manière générale, il a été montré qu'une augmentation de la variabilité des températures augmentait les niveaux de stress (Vasseur et al., 2014) et ainsi que le coût métabolique de l'acclimatation, le tout pouvant impacter négativement l'ensemble des processus physiologiques comme la reproduction et la longévité. (Marshall and Sinclair, 2011) ont mis en évidence que les fluctuations de températures étaient à l'origine d'un compromis entre la survie immédiate et la reproduction future chez *Drosophila melanogaster*. Enfin, Terblanche et al. (2010) ont aussi démontré que la fluctuation des températures pouvait affecter la tolérance ou la résistance aux évènements climatiques extrêmes de manière imprévisible.

Le changement climatique pourrait donc avoir d'importante implication pour la propagation de *B. xylophilus* en modifiant la biologie de son vecteur.

2.5. Quelles conséquences de ces résultats pour la gestion de l'expansion du nématode du pin ?

Actuellement, les mesures imposées par l'UE en cas de détection d'un arbre infesté par *B. xylophilus* sont la destruction sur place de l'arbre en question, la pratique d'une coupe rase autour de cet arbre sur un rayon de 500 m et la mise en place d'une zone tampon d'un rayon de 20 km autour du centre de la zone de coupe. Cette zone tampon est une zone dans laquelle la surveillance de l'apparition de nouveaux symptômes est particulièrement renforcée pendant une durée d'au moins quatre ans si aucun nouveau dépérissement suspect n'est découvert.

L'ensemble de ces mesures a des conséquences très importantes en termes économiques. En effet, la pratique de coupes rases en cas d'arrivée du nématode dans le massif forestier

landais représenterait rapidement des coûts extrêmement élevés avec des conséquences économiques très importantes pour la filière locale, rendant ces pratiques très difficiles à mettre en œuvre. Par exemple, avec un couvert forestier d'environ 100% et des densités de pins maritimes de l'ordre de 500 tiges/ha (fourchette basse), une coupe rase de 500m de rayon impliquerait l'abattage de plus de 40 000 arbres autour de chaque arbre déclaré porteur du nématode. Toutefois, Økland et al. (2010) ont démontré que pour être sûr d'éradiquer efficacement le nématode il faudrait pratiquer des coupes rases dans un rayon minimum de 8 km. La question de la pertinence de ces mesures se pose donc.

L'objectif des coupes rases est de détruire l'ensemble des arbres potentiellement colonisés par la population d'insectes ayant infecté l'arbre détecté comme "positif". Les événements d'inoculation arrivent à deux moments, lors des repas de maturation qui se prolongent durant les six premières semaines de la vie de l'insecte (Naves et al., 2007) puis lors de la ponte (Linit, 1990) qui peut se produire jusqu'à sa mort. Le rayon de coupe devrait donc être calé sur les capacités de dispersion de l'insecte durant l'ensemble de sa vie. Dans le chapitre III, nous avons montré que *M. galloprovincialis* était capable de voler 16 km sur l'ensemble de sa durée de vie avec un maximum de 63 km et près de 10 km durant les six premières semaines où l'inoculation est maximale (Naves et al., 2007). Même si cette distance est une distance potentielle estimée sur manège de vol et qui ne reflète pas totalement le comportement réel de dispersion de l'insecte en milieu naturel, nous avons également démontré que les vols unitaires réalisés par cette espèce étaient en moyenne d'1 km, ce qui est déjà supérieur au rayon des coupes rases et pouvaient aller jusqu'à 8,5 km. Ces estimations ne tiennent pas non plus compte du fait que les insectes dans la nature peuvent bénéficier de l'aide du vent pour augmenter la portée de leur vol. Ces distances vont donc bien au-delà des 500 m préconisés.

Les coupes rases représentent une perturbation physique majeure qui augmente le degré de fragmentation de l'habitat. (Bates et al., 2006). Jusqu'à présent, les *M. galloprovincialis* d'Aquitaine vivent dans un paysage où les ressources alimentaires sont régulièrement et densément distribuées. Dans ce type de paysage homogène, les mouvements de routine à faible distance sont plus fréquents que les mouvements directs à plus grande distance. Tandis que dans les paysages plus fragmentés, où la ressource est répartie en placettes plus espacées les unes des autres, les mouvements directs prennent une part plus importante dans la dispersion. Ainsi, la contribution des mouvements de routine à la dispersion est censée diminuer avec l'augmentation du degré de fragmentation au profit de mouvements directs

entre placettes (Baguette and Van Dyck, 2007). Il a également été montré que les papillons comme *P. aegeris* ont une mobilité plus importante lorsque la ressource est éparse (Hill et al., 2001; Merckx et al., 2003). Ainsi, la pratique de coupes rases pourrait mener à une augmentation de la mobilité des *Monochamus* en les poussant à exprimer plus de vols longs.

L'intérêt des coupes rases pourrait être également de déclencher un effet Allee en diminuant les populations d'insectes infestés en dessous du nombre d'individus nécessaires au maintien d'une reproduction efficace et donc de populations viables. Cependant, cela ne semble possible que dans les zones où les insectes sont totalement dépendants des arbres tués par le nématode pour assurer leur développement (Økland et al., 2010). Or, dans les Landes de Gascogne, le vecteur *M. galloprovincialis* est déjà présent et très largement répandu. Par exemple, plus de 16 000 individus ont été capturés dans 36 pièges installés en 2014 sur la commune de Marcheprime (communication personnelle). Les populations locales ont donc probablement beaucoup de substrat de développement à leur disposition, soit sous forme de résidus d'exploitation forestière (coupes d'éclaircie) soit sous forme de branches mortes dans le houppier des arbres âgés.

Nous pensons donc que l'abattage, un à un, et la destruction immédiate des arbres symptomatiques serait une meilleure solution que les coupes rases pour limiter l'expansion de la maladie. Cela coûterait sans doute moins cher et aurait moins d'impact sur la filière (moins d'afflux brusque dans l'approvisionnement des usines) tout en permettant de détruire une grande partie des substrats de ponte contaminés et des insectes nouvellement porteurs. Cela passe cependant par un renforcement des capacités de surveillance et de diagnostic. Une autre option serait la réduction du bois mort disponible pour la reproduction des *Monochamus* (Liebhold and Bascombe, 2003). L'élimination des résidus d'exploitation semble en effet plus réalisable et moins coûteuse à grande échelle que la pratique de coupes rases. Cependant, les bénéfices d'une telle méthode sont à comparer avec les effets négatifs qu'elle aurait sur la biodiversité associée au bois mort (Brin, 2008).

3. Perspectives de recherche

L'ensemble de ce travail de thèse nous a donc permis d'étudier en détails les capacités de vol de *Monochamus galloprovincialis*. Il nous a aussi permis d'aborder les stratégies d'allocation d'énergie chez un insecte longévif ainsi que les effets potentiels du changement

climatique sur les performances du vecteur du nématode du pin. Cependant, certaines questions restent encore à explorer.

3.1. *Quel comportement de dispersion dans un milieu où la ressource est moins abondante ?*

Nous avons précédemment montré que la dispersion de *Monochamus* dans une forêt homogène résultait principalement de mouvements de routine nécessaires à la recherche alimentaire et occasionnellement à des mouvements plus directs et plus longs pouvant permettre de localiser une ressource plus rare comme les sites de ponte.

Dans une forêt plus fragmentée, notamment par des coupes rases, la ressource est plus espacée, les vols plus longs deviennent alors plus fréquents. Cependant, la fragmentation du paysage n'a d'effet positif sur l'occurrence des vols directs à longue distance que tant qu'elle n'est pas trop importante. En effet, passé un certain seuil de distance entre patchs d'habitat favorable, il a été montré que la capacité de dispersion à plus longue distance (inter fragments) était contre-sélectionnée au profit de vols à courtes distances (intra fragments) (Baguette and Van Dyck, 2007) car le rapport coût (risque de mortalité) / bénéfice (découverte de nouvelles ressources) de la dispersion devient alors trop important (Bonte et al., 2012).

Par contre dans une forêt mélangée de pins et de feuillus par exemple, la ressource se trouve diluée dans un paysage non fragmenté (Castagneyrol et al., 2014). Dans ce cas, c'est l'hétérogénéité de composition et non de configuration (Fahrig et al., 2011) qui peut interférer avec les mouvements de dispersion de l'insecte à la recherche de ses ressources vitales. Dans ce cas, on peut émettre l'hypothèse que soit les *Monochamus* considèrent le milieu hostile et alors privilégient des vols longs, directs, d'évitement, pour fuir cette forêt et rechercher de nouveaux habitats, soit ils maintiennent des mouvements de routine à courte distance mais doivent alors prospecter plus longtemps pour localiser leurs arbres hôtes. Dans les deux cas, le coût du vol, en terme d'énergie dépensée et de risque de mortalité, s'en verrait augmenté, limitant le taux de reproduction de l'insecte.

Il serait donc intéressant de mener des études complémentaires, par exemple de lâchers - recaptures, pour vérifier la validité de ces hypothèses.

3.2. Quel est l'effet de la charge en nématodes sur les capacités de vol de *M. galloprovincialis* ?

La relation phorétique qui lie *B. xylophilus* et ses différents insectes vecteurs a récemment été largement précisée (Zhao et al., 2014, 2013a, 2013b), confirmant que *B. xylophilus* envahit le système respiratoire des insectes lors de la nymphose. Cette charge supplémentaire pourrait provoquer une diminution des capacités de dispersion surtout lorsqu'elle est très importante, *i.e.* supérieure à 10 000 nématodes (Akbulut and Linit, 1999; Humphry and Linit, 1989).

En 2013, nous avons donc réalisé au Portugal, dans le cadre du projet REPHRAME, en collaboration avec l'équipe d'Edmundo Sousa au sein de l'INIAV (Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária), une expérimentation visant à explorer l'effet de la charge en nématodes sur les capacités de vol de *M. galloprovincialis*, notamment au stade immature.

Du bois mort issu de la région de Setubal (région infestée par le nématode du pin) à été collecté afin de nous fournir des insectes avec un gradient de charge en nématodes le plus naturel possible. Dès l'émergence, les insectes ont été testés sur manège de vol pendant deux heures suivant le protocole du chapitre III (David et al., 2014). Juste après le test, les insectes ont été tués puis immergés dans de l'eau afin d'en extraire les nématodes qui ont ensuite été comptés sous microscope.

Tableau 1. Résultats des modèles linéaire et linéaire généralisé testant l'effet du sexe, du poids à l'émergence et de la présence de nématodes sur les capacités de vol de *M. galloprovincialis*

Variables de réponse	Effets fixes	df	Valeur de X^2 ou de F^*
Probabilité de vol (n = 98)	Sexe	1	1.32
	Poids à l'émergence	1	0.01
	Présence de nématode	1	0.26
Distance parcourue (n = 39)	Sexe	1,39	0.03
	Poids à l'émergence	1,39	0.45
	Présence de nématode	1,39	0.97

X^2 pour la probabilité de vol et test F pour la distance parcourue. Tous ces tests sont non-significatifs ($P > 0.05$).

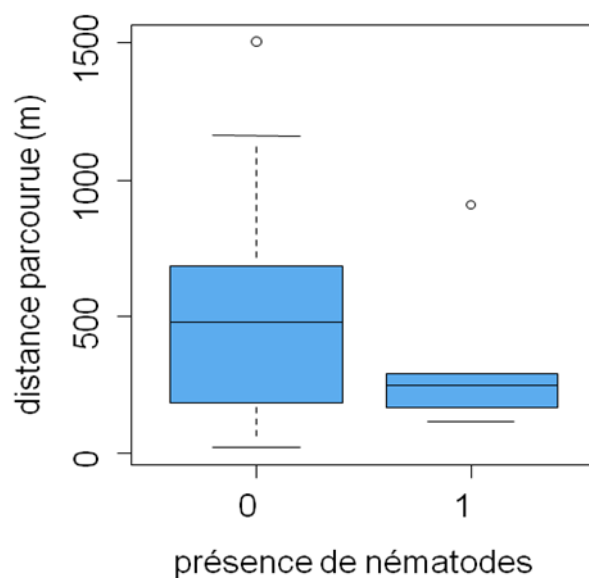


Fig. Distance parcourue en fonction de la présence de nématodes

Nous avons ainsi testé 98 insectes. Malheureusement, seuls 15 se sont révélés, *a posteriori*, porteurs de nématodes et avec des charges très faibles allant de quelques nématodes comptabilisés à une centaine d'individus. Nous n'avons pas pu montrer d'effet de la présence de nématodes mais le faible nombre d'insectes porteurs et les faibles abondances de nématodes ne nous ont pas permis de tester convenablement l'effet de la charge en nématodes (Tableau 1, Fig.1). Cette question reste donc à explorer avec un échantillon plus important présentant un gradient plus marqué avec des charges plus importantes. Une

solution idéale serait de mettre au point une méthode permettant de contrôler la charge en nématodes des insectes, notamment en les inoculant au stade nymphal dans le cadre d'un élevage au laboratoire.

3.3. Comment le sexe et le statut de maturation influence la reconnaissance de l'arbre hôte chez *M. galloprovincialis* ?

Un autre aspect de la biologie de *M. galloprovincialis* qui reste peu exploré est la détection de l'arbre hôte par l'adulte en phase de dispersion. En effet, au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à différents aspect du vol, son origine, son maintien et ses différents types. Cependant, nous n'avons pas exploré les stimuli qui déterminent l'arrêt de la prospection c'est-à-dire la sélection de l'arbre hôte.

Il a été montré que les adultes matures des deux sexes utilisent les volatiles émis par les pins afin de localiser leur hôte. En effet, *M. galloprovincialis* utilise comme kairomones l' α -pinène, l'un des principaux composant de la résine de pin mais aussi des phéromones de scolytes comme l'ipsénol et l'ipsdienol, tous les deux révélateurs d'arbres dépérissants ou déjà infestés par des espèces xylophages primaires (Ibeas et al., 2007; Ibeas et al., 2008; Pajares et al., 2004). Cependant, très peu d'informations sont disponibles sur les immatures puisqu'ils ne répondent pas aux odeurs d'arbres dépérissants.

Associée à ce travail de thèse, une étude a été réalisée (Giffard, David et al, in prep ; annexe 1) afin de tester l'utilisation de stimuli olfactifs et visuels dans le comportement de sélection de l'arbre hôte chez des *M. galloprovincialis* matures et immatures. En utilisant des pins artificiels pour tester l'importance des stimuli visuels et un olfactomètre pour les stimuli olfactifs, nous avons pu mettre en évidence des réponses comportementales contrastées. En effet, les femelles immatures ne semblent répondre qu'aux stimuli olfactifs tandis qu'après la maturation elles utilisent également des stimuli visuels. Cela indique que la maturation pourrait être un processus physiologique plus complexe impliquant d'autres fonctions vitales que la seule oogenèse (P. Naves et al., 2006). En ce qui concerne les mâles, ils semblent utiliser une combinaison de stimuli olfactifs et visuels tout au long de leur vie. L'absence d'effet de la maturation est peut-être dû au fait qu'ils sont sexuellement matures et capables d'inséminer les femelles peu de temps après l'émergence (P. Naves et al., 2006).

4. Conclusions

Nous avons donc pu démontrer que *M. galloprovincialis* est un insecte synovogénique et que sa capacité de dispersion semble résulter principalement de mouvements de routine. Ce "syndrome" de dispersion est typique d'une activité de recherche alimentaire dans un paysage homogène et essentiellement dictée par le besoin de fournir l'énergie nécessaire à l'oogénèse chez la femelle. Chez le mâle, il favoriserait la rencontre avec les femelles pour assurer la fonction de reproduction.

La capacité de vol chez *M. galloprovincialis* (les vols unitaires sont de 1 km en moyenne mais peuvent aller jusqu'à 8,5 km) est présente dès l'émergence et se conserve tout au long de la vie des insectes. L'amplitude de dispersion de l'espèce semble donc dépendre surtout de la longévité des adultes que nous avons réévaluée à environ 4 mois. Elle pourrait être affectée par le changement climatique, augmentant avec la réduction des amplitudes thermiques.

L'ensemble de ces résultats nous apportent des informations supplémentaires sur la biologie de *M. galloprovincialis* qui peuvent être essentielles pour une meilleure gestion de la propagation du nématode du pin en Europe. En particulier, les données recueillies sur les capacités de dispersion devraient servir à mieux paramétrer le modèle de dispersion du nématode du pin qui est en cours de développement dans le cadre du projet REPHRAME (Robinet et al. in prep).

Avant d'être le vecteur du nématode exotique *B. xylophilus*, *M. galloprovincialis* est un coléoptère saproxylique se développant sur le bois mort des forêts de pin du sud de l'Europe. Il constitue donc un modèle intéressant pour étudier la dynamique de ce compartiment clé de la biodiversité forestière. Les connaissances accumulées dans cette thèse sur les capacités et comportement de dispersion pourraient en particulier permettre de mieux comprendre l'effet de la gestion des forêts sur l'abondance des coléoptères saproxyliques, aussi bien à l'échelle des peuplements (ex. rémanents d'exploitation générant du bois mort) qu'à l'échelle des paysages (ex. fragmentation par les coupes rases), et donc améliorer leur conservation.

Références

Bibliographiques

- Aikawa, T., Togashi, K., others, 2000. Movement of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) in tracheal system of adult *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Nematology* 2, 495–500.
- Akbulut, S., Keten, A., Stamps, W.T., 2008. Population dynamics of *Monochamus galloprovincialis* Olivier (Coleoptera: Cerambycidae) in two pine species under laboratory conditions. *J. Pest Sci.* 81, 115–121. doi:10.1007/s10340-008-0195-z
- Akbulut, S., Linit, M.J., 1999. Flight performance of *Monochamus carolinensis* (Coleoptera: Cerambycidae) with respect to nematode phoresis and beetle characteristics. *Environ. Entomol.* 28, 1014–1020.
- Akbulut, S., Stamps, W.T., 2012. Insect vectors of the pinewood nematode: a review of the biology and ecology of *Monochamus* species. *For. Pathol.* 42, 89–99. doi:10.1111/j.1439-0329.2011.00733.x
- Akbulut, S., Stamps, W.T., Linit, M.J., 2004. Population dynamics of *Monochamus carolinensis* (Col., Cerambycidae) under laboratory conditions. *J. Appl. Entomol.* 128, 17–21. doi:10.1046/j.1439-0418.2003.00798.x
- Allison, J.D., Borden, J.H., Seybold, S.J., 2004. A review of the chemical ecology of the Cerambycidae (Coleoptera). *Chemoecology* 14, 123–150.
- Alsop, F.J., Laughlin, T.F., 1991. Changes in the spruce–fir avifauna of Mt. Guyot, Tennessee, 1967–1985. *J. Tenn. Acad. Sci.* 66, 207–209.
- Anonymous, 2012. Commission implementing decision on emergency measures to prevent the spread within the Union of *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhrer) Nickle et al. (the pine wood nematode). Official Journal of the European Union. L 266/442–452.
- Anonymous, 2013. Boletín Oficial de Castilla y León (No. 249).
- Anonymous, 2014. World catalog of Lamiinae cerambycids. *World Cat. Lamiinae Cerambycids*.
- Atkins, M.D., 1961. A study of the flight of the douglas-fir beetle *Dendroctonus pseudotsugae* hopk. (Coleoptera: Scolytidae): iii flight capacity. *Can. Entomol.* 93, 467–474. doi:10.4039/Ent93467-6
- Baars, M.A., 1979. Patterns of movement of radioactive carabid beetles. *Oecologia* 44, 125–140.
- Baguette, M., Van Dyck, H., 2007. Landscape connectivity and animal behavior: functional grain as a key determinant for dispersal. *Landsc. Ecol.* 22, 1117–1129. doi:10.1007/s10980-007-9108-4

- Bates, A.J., Sadler, J.P., Fowles, A.P., 2006. Condition-dependent dispersal of a patchily distributed riparian ground beetle in response to disturbance. *Oecologia* 150, 50–60. doi:10.1007/s00442-006-0508-y
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., 2012. lme4: Linear mixed-effects models using S4 classes.
- Beenackers, A.M.T., Van der Horst, D.J., Van Marrewijk, W.J.A., 1984. Insect flight muscle metabolism. *Insect Biochem.* 14, 243–260. doi:10.1016/0020-1790(84)90057-X
- Begon, M., Townsend, C.R., Harper, J.L., 2009. *Ecology: From Individuals to Ecosystems*. John Wiley & Sons.
- Bergdahl, D.R., 1988. Impact of Pinewood Nematode in North America: Present and Future. *J. Nematol.* 20, 260–265.
- Boggs, C.L., 1981. Nutritional and life-history determinants of resource allocation in holometabolous insects. *Am. Nat.* 117, 692–709.
- Boggs, C.L., 1992. Resource allocation: exploring connections between foraging and life history. *Funct. Ecol.* 6, 508–518. doi:10.2307/2390047
- Boggs, C.L., 1997a. Reproductive allocation from reserves and income in butterfly species with differing adult diets. *Ecology* 78, 181–191.
- Boggs, C.L., 1997b. Dynamics of reproductive allocation from juvenile and adult feeding: radiotracer studies. *Ecology* 78, 192–202.
- Boggs, C.L., 2003. Environmental variation, life histories, and allocation. *Butterflies Ecol. Evol. Tak. Flight* 185–206.
- Boggs, C.L., 2009. Understanding insect life histories and senescence through a resource allocation lens. *Funct. Ecol.* 23, 27–37. doi:10.1111/j.1365-2435.2009.01527.x
- Boggs, C.L., Freeman, K.D., 2005. Larval food limitation in butterflies: effects on adult resource allocation and fitness. *Oecologia* 144, 353–361. doi:10.1007/s00442-005-0076-6
- Boggs, C., Ross, C., 1993. The effect of adult food limitation on life-history traits in *Speyeria mormonia* (Lepidoptera, Nymphalidae). *Ecology* 74, 433–441. doi:10.2307/1939305
- Bonte, D., Van Dyck, H., Bullock, J.M., Coulon, A., Delgado, M., Gibbs, M., Lehouck, V., Matthysen, E., Mustin, K., Saastamoinen, M., Schtickzelle, N., Stevens, V.M., Vandewoestijne, S., Baguette, M., Barton, K., Benton, T.G., Chaput-Bardy, A., Clobert, J., Dytham, C., Hovestadt, T., Meier, C.M., Palmer, S.C.F., Turlure, C., Travis, J.M.J., 2012. Costs of dispersal. *Biol. Rev.* 87, 290–312. doi:10.1111/j.1469-185X.2011.00201.x
- Botero-Garcés, N., Isaacs, R., 2004. Movement of the grape berry moth, *Endopiza viteana*: displacement distance and direction. *Physiol. Entomol.* 29, 443–452.

- Bozinovic, F., Bastías, D.A., Boher, F., Clavijo-Baquet, S., Estay, S.A., Angilletta, M.J., 2011. The Mean and Variance of Environmental Temperature Interact to Determine Physiological Tolerance and Fitness. *Physiol. Biochem. Zool.* 84, 543–552. doi:10.1086/662551
- Brin, A., 2008. Le bois mort et les dans les plantations de pin ma Implications possibles pour la l'élaboration d'indicateur.
- Brockerhoff, E.G., Kimberley, M., Liebhold, A.M., Haack, R.A., Cavey, J.F., 2013. Predicting how altering propagule pressure changes establishment rates of biological invaders across species pools. *Ecology* 95, 594–601. doi:10.1890/13-0465.1
- Bullock, J.M., Kenward, R.E., Hails, R., Hails, R.S., 2002. Dispersal ecology: 42nd symposium of the British Ecological Society. Cambridge University Press.
- Candy, D.J., Becker, A., Wegener, G., 1997. Coordination and integration of metabolism in insect flight. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 117, 497–512. doi:10.1016/S0305-0491(97)00212-5
- Casas, J., Pincebourde, S., Mandon, N., Vannier, F., Poujol, R., Giron, D., 2005. Lifetime nutrient dynamics reveal simultaneous capital and income breeding in a parasitoid. *Ecology* 86, 545–554. doi:10.1890/04-0812
- Casas, J., Vannier, F., Mandon, N., Delbecq, J.P., Giron, D., Monge, J.P., 2009. Mitigation of egg limitation in parasitoids: immediate hormonal response and enhanced oogenesis after host use. *Ecology* 90, 537–545. doi:10.1890/08-0507.1
- Castagneyrol, B., Jactel, H., Vacher, C., Brockerhoff, E.G., Koricheva, J., 2014. Effects of plant phylogenetic diversity on herbivory depend on herbivore specialization. *J. Appl. Ecol.* 51, 134–141. doi:10.1111/1365-2664.12175
- Chapman, R.F., Simpson, S.J., Douglas, A.E., 2013. The insects: structure and function. Cambridge University Press.
- Cheng, H.R., Lin, M., Li, W., Fang, Z., 1983. The occurrence of a pine wilting disease caused by a nematode found in Nanjing. *For. Pest Dis.* 4, 1–5.
- Chown, S.L., Hoffmann, A.A., Kristensen, T.N., Angilletta Jr, M.J., Stenseth, N.C., Pertoldi, C., 2010. Adapting to climate change: a perspective from evolutionary physiology. *Clim. Res. Open Access Artic.* 4 Years Old Older 43, 3.
- Ciesla, William M., 2001. EXFOR Database Pest Report: *Monochamus alternatus*. USDA Forest Service.
- Clobert, J., Danchin, E., Dhont, A.A., Nichols, J., 2001. Dispersal—causes, consequences and mechanisms of dispersal at the individual, population and community level. Oxford University Press, Oxford.
- Cody, M.L., 1966. A general theory of clutch size. *Evolution* 20, 174–184. doi:10.2307/2406571

- Colautti, R.I., Bailey, S.A., Overdijk, C.D.A. van, Amundsen, K., MacIsaac, H.J., 2006. Characterised and Projected Costs of Nonindigenous Species in Canada. *Biol. Invasions* 8, 45–59. doi:10.1007/s10530-005-0236-y
- Coll, M., Yuval, B., 2004. Larval food plants affect flight and reproduction in an oligophagous insect herbivore. *Environ. Entomol.* 33, 1471–1476. doi:10.1603/0046-225X-33.5.1471
- Crawley, M.J., 2012. *The R Book*. John Wiley & Sons.
- David, G., Giffard, B., Piou, D., Jactel, H., 2014. Dispersal capacity of *Monochamus galloprovincialis*, the European vector of the pine wood nematode, on flight mills. *J. Appl. Entomol.* 138, 566–576. doi:10.1111/jen.12110
- Denno, R.F., Gratton, C., Langellotto, G.A., Woiwood, I.P., Reynolds, D.R., Thomas, C.D., others, 2001. Significance of habitat persistence and dimensionality in the evolution of insect migration strategies., in: *Insect Movement: Mechanisms and Consequences*. Proceedings of the Royal Entomological Society's 20th Symposium, London, UK, September 1999. CABI, pp. 235–259.
- Deutsch, C.A., Tewksbury, J.J., Huey, R.B., Sheldon, K.S., Ghalambor, C.K., Haak, D.C., Martin, P.R., 2008. Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 6668–6672. doi:10.1073/pnas.0709472105
- Dixon, A.F.G., Horth, S., Kindlmann, P., 1993. Migration in Insects: Cost and Strategies. *J. Anim. Ecol.* 62, 182–190. doi:10.2307/5492
- Drag, L., Hauck, D., Pokluda, P., Zimmermann, K., Cizek, L., 2011. Demography and dispersal ability of a threatened saproxylic beetle: a mark-recapture study of the *Rosalia longicorn* (*Rosalia alpina*). *PloS One* 6, e21345.
- Dudley, R., Srygley, R., 1994. Flight physiology of neotropical butterflies: allometry of airspeeds during natural free flight. *J. Exp. Biol.* 191, 125–139.
- Edwards, J.S., 2006. The central nervous control of insect flight. *J. Exp. Biol.* 209, 4411–4413.
- Edwards, O.R., Linit, M.J., 1991. Oviposition behavior of *Monochamus carolinensis* (Coleoptera: Cerambycidae) infested with the pinewood nematode. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 84, 319–323.
- Ellers, J., Jervis, M.A., 2004. Why are so few parasitoid wasp species pro-ovigenic? *Evol. Ecol. Res.* 6, 993–1002.
- Ellers, J., Sevenster, Jan G., Driessen, G., 2000. Egg Load Evolution in Parasitoids. *Am. Nat.* 156, 650–665. doi:10.1086/an.2000.156.issue-6
- Ellers, J., Van Alphen, J.J.M., 1997. Life history evolution in *Asobara tabida*: plasticity in allocation of fat reserves to survival and reproduction. *J. Evol. Biol.* 10, 771–785. doi:10.1046/j.1420-9101.1997.10050771.x

- Enda, N., 1985. The flight ability of the Japanese pine-sawyer (Coleoptera, Cerambycidae) as determined by a flight-mill instrument, in: Transactions of the 96th Meeting of Japanese Forest Society. pp. 517–518.
- Essl, F., Dullinger, S., Rabitsch, W., Hulme, P.E., Hülber, K., Jarošík, V., Kleinbauer, I., Krausmann, F., Kühn, I., Nentwig, W., Vilà, M., Genovesi, P., Gherardi, F., Desprez-Loustau, M.-L., Roques, A., Pyšek, P., 2011. Socioeconomic legacy yields an invasion debt. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 203–207. doi:10.1073/pnas.1011728108
- Estay, S.A., Clavijo-Baquet, S., Lima, M., Bozinovic, F., 2011. Beyond average: an experimental test of temperature variability on the population dynamics of *Tribolium confusum*. *Popul. Ecol.* 53, 53–58. doi:10.1007/s10144-010-0216-7
- Evans, H.F., McNamara, D.G., Braasch, H., Chadoeuf, J., Magnusson, C., 1996. Pest Risk Analysis (PRA) for the territories of the European Union (as PRA area) on *Bursaphelenchus xylophilus* and its vectors in the genus *Monochamus*. *EPPO Bull.* 26, 199–249. doi:10.1111/j.1365-2338.1996.tb00594.x
- Fadamiro, H.Y., Chen, L., O. Onagbola, E., Graham, L. “FUDD,” 2005. Lifespan and patterns of accumulation and mobilization of nutrients in the sugar-fed phorid fly, *Pseudacteon tricuspis*. *Physiol. Entomol.* 30, 212–224. doi:10.1111/j.1365-3032.2005.00449.x
- Fahrig, L., Baudry, J., Brotons, L., Burel, F.G., Crist, T.O., Fuller, R.J., Sirami, C., Siriwardena, G.M., Martin, J.-L., 2011. Functional landscape heterogeneity and animal biodiversity in agricultural landscapes. *Ecol. Lett.* 14, 101–112.
- Fischer, D., Thomas, S.M., Niemitz, F., Reineking, B., Beierkuhnlein, C., 2011. Projection of climatic suitability for *Aedes albopictus* Skuse (Culicidae) in Europe under climate change conditions. *Glob. Planet. Change* 78, 54–64. doi:10.1016/j.gloplacha.2011.05.008
- Fischer, H., Kutsch, W., 2000. Relationships between body mass, motor output and flight variables during free flight of juvenile and mature adult locusts, *Schistocerca gregaria*. *J. Exp. Biol.* 203, 2723–2735.
- Fischer, K., O’Brien, D.M., Boggs, C.L., 2004. Allocation of larval and adult resources to reproduction in a fruit-feeding butterfly. *Funct. Ecol.* 18, 656–663. doi:10.1111/j.0269-8463.2004.00892.x
- Franzen, M., Nilsson, S.G., 2007. What is the required minimum landscape size for dispersal studies? *J. Anim. Ecol.* 76, 1224–1230.
- Futai, K., 2013. Pine Wood Nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51, 61–83. doi:10.1146/annurev-phyto-081211-172910
- Gallego, D., Sanchez-Garcia, F.J., Mas, H., Campo, M.T., Lencina, J.L., 2012. Estudio de la capacidad de vuelo a larga distancia de “*Monochamus galloprovincialis*” (Olivier 1795). (Coleoptera: Cerambycidae) en un mosaico agro-forestal. *Bol. Sanid. Veg. Plagas* 38, 109–124.

- Glazier, D.S., 1999. Trade-offs between reproductive and somatic (storage) investments in animals: a comparative test of the Van Noordwijk and De Jong model. *Evol. Ecol.* 13, 539–555. doi:10.1023/A:1006793600600
- Guerra, P.A., 2011. Evaluating the life-history trade-off between dispersal capability and reproduction in wing dimorphic insects: a meta-analysis. *Biol. Rev.* 86, 813–835. doi:10.1111/j.1469-185X.2010.00172.x
- Gu, H., Hughes, J., Dorn, S., 2006. Trade-off between mobility and fitness in *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae). *Ecol. Entomol.* 31, 68–74. doi:10.1111/j.0307-6946.2006.00761.x
- Hack, R.A., McCullough, D.G., 1993. Update on the pine shoot beetle. *Mich Christmas Tree J* 36, 20–21.
- Hansen, J., Sato, M., Ruedy, R., Lo, K., Lea, D.W., Medina-Elizade, M., 2006. Global temperature change. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 14288–14293. doi:10.1073/pnas.0606291103
- Hanski, I., Breuker, C.J., Schöps, K., Setchfield, R., Nieminen, M., 2002. Population history and life history influence the migration rate of female Glanville fritillary butterflies. *Oikos* 98, 87–97. doi:10.1034/j.1600-0706.2002.980109.x
- Hanski, I., Saastamoinen, M., Ovaskainen, O., 2006. Dispersal-related life-history trade-offs in a butterfly metapopulation. *J. Anim. Ecol.* 75, 91–100. doi:10.1111/j.1365-2656.2005.01024.x
- Hastings, A., 1992. Age dependent dispersal is not a simple process: Density dependence, stability, and chaos. *Theor. Popul. Biol.* 41, 388–400. doi:10.1016/0040-5809(92)90036-S
- Hedin, J., Ranius, T., 2002. Using radio telemetry to study dispersal of the beetle *Osmoderma eremita*, an inhabitant of tree hollows. *Comput. Electron. Agric.* 35, 171–180. doi:10.1016/S0168-1699(02)00017-0
- Higgins, S.I., Richardson, D.M., Cowling, R.M., 2000. Using a dynamic landscape model for planning the management of alien plant invasions. *Ecol. Appl.* 10, 1833–1848. doi:10.1890/1051-0761(2000)010[1833:UADLMF]2.0.CO;2
- Hill, J. k., Collingham, Y. c., Thomas, C. d., Blakeley, D. s., Fox, R., Moss, D., Huntley, B., 2001. Impacts of landscape structure on butterfly range expansion. *Ecol. Lett.* 4, 313–321. doi:10.1046/j.1461-0248.2001.00222.x
- Hill, J.K., Griffiths, H.M., Thomas, C.D., 2011. Climate Change and Evolutionary Adaptations at Species' Range Margins. *Annu. Rev. Entomol.* 56, 143–159. doi:10.1146/annurev-ento-120709-144746
- Hoffmann, A.A., 2010. Physiological climatic limits in *Drosophila*: patterns and implications. *J. Exp. Biol.* 213, 870–880.

- Hoffmann, A.A., Anderson, A., Hallas, R., 2002. Opposing clines for high and low temperature resistance in *Drosophila melanogaster*. *Ecol. Lett.* 5, 614–618. doi:10.1046/j.1461-0248.2002.00367.x
- Hughes, C.L., Hill, J.K., Dytham, C., 2003. Evolutionary trade-offs between reproduction and dispersal in populations at expanding range boundaries. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 270, S147–S150. doi:10.1098/rsbl.2003.0049
- Hughes, J., Dorn, S., 2002. Sexual differences in the flight performance of the oriental fruit moth, *Cydia molesta*. *Entomol. Exp. Appl.* 103, 171–182.
- Humphry, S.J., Linit, M.J., 1989. Effect of Pinewood Nematode Density on Tethered Flight of *Monochamus carolinensis* (Coleoptera: Cerambycidae). *Environ. Entomol.* 18, 670–673.
- Ibeas, F., Díez, J.J., Pajares, J.A., 2008. Olfactory sex attraction and mating behaviour in the pine sawyer *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera: Cerambycidae). *J. Insect Behav.* 21, 101–110.
- Ibeas, F., Gallego, D., Díez, J.J., Pajares, J.A., 2007. An operative kairomonal lure for managing pine sawyer beetle *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera: Cerymbcidae). *J. Appl. Entomol.* 131, 13–20.
- Ims, R.A., 1995. Movement patterns related to spatial structures, in: Hansson, L., Fahrig, L., Merriam, G. (Eds.), *Mosaic Landscapes and Ecological Processes*. Springer Netherlands, pp. 85–109.
- Jactel, H., Gaillard, J., 1991. A preliminary study of the dispersal potential of *Ips sexdentatus* (Boern) (Col., Scolytidae) with an automatically recording flight mill. *J. Appl. Entomol.* 112, 138–145. doi:10.1111/j.1439-0418.1991.tb01039.x
- James, R., Tisserat, N., Todd, T., 2006. Prevention of pine wilt of scots pine (*Pinus sylvestris*) with systemic abamectin injections. *Arboric. URBAN For.* 32, 195.
- Jervis, M.A., Boggs, C.L., Ferns, P.N., 2005. Egg maturation strategy and its associated trade-offs: a synthesis focusing on Lepidoptera. *Ecol. Entomol.* 30, 359–375. doi:10.1111/j.0307-6946.2005.00712.x
- Jervis, M.A., Boggs, C.L., Ferns, P.N., 2007. Egg maturation strategy and survival trade-offs in holometabolous insects: a comparative approach. *Biol. J. Linn. Soc.* 90, 293–302. doi:10.1111/j.1095-8312.2007.00721.x
- Jervis, M.A., Ellers, J., Harvey, J.A., 2008. Resource acquisition, allocation, and utilization in parasitoid reproductive strategies. *Annu. Rev. Entomol.* 53, 361–385. doi:10.1146/annurev.ento.53.103106.093433
- Jervis, M.A., Ferns, P.N., 2004. The timing of egg maturation in insects: ovigeny index and initial egg load as measures of fitness and of resource allocation. *Oikos* 107, 449–461.
- Jervis, M.A., Ferns, P.N., Heimpel, G.E., 2003. Body size and the timing of egg production in parasitoid wasps: a comparative analysis. *Funct. Ecol.* 17, 375–383.

- Jervis, M.A., Heimpel, G.E., Ferns, P.N., Harvey, J.A., Kidd, N.A.C., 2001. Life-history strategies in parasitoid wasps: a comparative analysis of “ovigeny.” *J. Anim. Ecol.* 70, 442–458. doi:10.1046/j.1365-2656.2001.00507.x
- Johnson, C.G., 1969. Migration and dispersal of insects by flight. xxii+763 pp.
- Katsuyama, N., Sakurai, H., Tabata, K., Takeda, S., 1989. Effect of age of post-feeding twig on the ovarian development of Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus*. *Res. Bull. Fac. Agric. Gifu Univ.* 81–89.
- Khuhro, N.H., Biondi, A., Desneux, N., Zhang, L., Zhang, Y., Chen, H., 2014. Trade-off between flight activity and life-history components in *Chrysoperla sinica*. *BioControl* 1–9. doi:10.1007/s10526-014-9560-4
- Kingsolver, J.G., Diamond, S.E., Buckley, L.B., 2013. Heat stress and the fitness consequences of climate change for terrestrial ectotherms. *Funct. Ecol.* 27, 1415–1423. doi:10.1111/1365-2435.12145
- Kingsolver, J.G., Ragland, G.J., Diamond, S.E., 2009. Evolution in a constant environment: thermal fluctuations and thermal sensitivity of laboratory and field populations of *Manduca sexta*. *Evol. Int. J. Org. Evol.* 63, 537–541. doi:10.1111/j.1558-5646.2008.00568.x
- Kishi, Y., 1995. Pine wood nematode and the Japanese pine sawyer. Thomas Company Limited.
- Kobayashi, F., Yamane, A., Ikeda, T., 1984. The Japanese pine sawyer beetle as the vector of pine wilt disease. *Annu. Rev. Entomol.* 29, 115–135.
- Kolar, C.S., Lodge, D.M., 2001. Progress in invasion biology: predicting invaders. *Trends Ecol. Evol.* 16, 199–204. doi:10.1016/S0169-5347(01)02101-2
- Kondo, E., Ishibashi, N., 1978. Ultrastructural Differences between the Propagative and Dispersal. Forms in Pine Wood Nematode, *Bursaphelenchus*.
- Kuras, T., Benes, J., Fric, Z., Konvicka, M., 2003. Dispersal patterns of endemic alpine butterflies with contrasting population structures: *Erebia epiphron* and *E. sudetica*. *Popul. Ecol.* 45, 115–123.
- Kuroda, K., 2008. Physiological Incidences Related to Symptom Development and Wilting Mechanism, in: Zhao, B.G., Futai, K., Sutherland, J.R., Takeuchi, Y. (Eds.), *Pine Wilt Disease*. Springer Japan, pp. 204–222.
- Lavergne, S., Mouquet, N., Thuiller, W., Ronce, O., 2010. Biodiversity and Climate Change: Integrating Evolutionary and Ecological Responses of Species and Communities. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 41, 321–350. doi:10.1146/annurev-ecolsys-102209-144628
- Liebhold, A., Bascompte, J., 2003. The Allee effect, stochastic dynamics and the eradication of alien species. *Ecol. Lett.* 6, 133–140. doi:10.1046/j.1461-0248.2003.00405.x

- Liebhold, A.M., MacDonald, W.L., Bergdahl, D., Mastro, V.C., 1995. Invasion by exotic forest pests: a threat to forest ecosystems. *For. Sci.* 41, a0001–z0001.
- Liebhold, A.M., Tobin, P.C., 2008. Population Ecology of Insect Invasions and Their Management*. *Annu. Rev. Entomol.* 53, 387–408.
doi:10.1146/annurev.ento.52.110405.091401
- Li, H., Shen, P., Fu, P., Lin, M., Moens, M., 2007. Characteristics of the emergence of *Monochamus alternatus*, the vector of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae), from *Pinus thunbergii* logs in Nanjing, China, and of the transmission of the nematodes through feeding wounds. *Nematology* 9, 807–816.
- Linit, M., Akbulut, S., Mota, M., Vieira, P., others, 2004. Pine wood nematode phoresis: the impact on *Monochamus carolinensis* life functions., in: *The Pinewood Nematode, Bursaphelenchus Xylophilus. Proceedings of an International Workshop, University of Évora, Portugal, 20-22 August 2001.* Brill Academic Publishers, pp. 227–237.
- Linit, M.J., 1988. Nematode-vector relationships in the pine wilt disease system. *J. Nematol.* 20, 227.
- Linit, M.J., 1990. Transmission of pinewood nematode through feeding wounds of *Monochamus carolinensis* (Coleoptera: Cerambycidae). *J. Nematol.* 22, 231.
- Linit, M.J., Kondo, E., Smith, M.T., 1983. Insects Associated with the Pinewood Nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae), in Missouri. *Environ. Entomol.* 12, 467–470.
- Loope, L.L., Hamann, O., Stone, C.P., 1988. Comparative Conservation Biology of Oceanic Archipelagoes: Hawaii and the Galápagos. *BioScience* 38, 272–282.
doi:10.2307/1310851
- Lorenz, M.W., 2007. Oogenesis-flight syndrome in crickets: Age-dependent egg production, flight performance, and biochemical composition of the flight muscles in adult female *Gryllus bimaculatus*. *J. Insect Physiol.*, VIII European Congress of Entomology - Physiology and Endocrinology 53, 819–832. doi:10.1016/j.jinsphys.2007.03.011
- Mack, R.N., Simberloff, D., Mark Lonsdale, W., Evans, H., Clout, M., Bazzaz, F.A., 2000. Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences, and control. *Ecol. Appl.* 10, 689–710. doi:10.1890/1051-0761(2000)010[0689:BICEGC]2.0.CO;2
- Maes, D., Vanreusel, W., Talloen, W., Dyck, H.V., 2004. Functional conservation units for the endangered Alcon Blue butterfly *Maculinea alcon* in Belgium (Lepidoptera: Lycaenidae). *Biol. Conserv.* 120, 229–241.
- Mamiya, Y., 1972. Pine wood nematode, *Bursaphelenchus lignicolus* Mamiya and Kiyohara, as a causal agent of pine wilting disease. *Rev. Plant Prot. Res.* 5, 46–60.
- Mamiya, Y., 1987. Origin of the pine wood nematode and its distribution outside the United States. *Pathog. Pine Wood Nematode* APS Press St Paul 59–65.
- Mamiya, Y., 1988. History of pine wilt disease in Japan. *J. Nematol.* 20, 219.

- Mamiya, Y., Kiyohara, T., 1972. Description of *Bursaphelenchus lignicolus* n. sp. (Nematoda: Aphelenchoididae) from pine wood and histopathology of nematode-infested trees. *Nematologica* 18, 120–124.
- Mamiya, Y., Nickle, W.R., others, 1984. The pine wood nematode. *Plant Insect Nematodes* 589–626.
- Marden, J.H., 2000. Variability in the Size, Composition, and Function of Insect Flight Muscles. *Annu. Rev. Physiol.* 62, 157–178. doi:10.1146/annurev.physiol.62.1.157
- Marshall, K.E., Sinclair, B.J., 2011. The sub-lethal effects of repeated freezing in the woolly bear caterpillar *Pyrrharctia isabella*. *J. Exp. Biol.* 214, 1205–1212. doi:10.1242/jeb.054569
- Mas, H., Hernandez, R., Villaroya, M., Sanchez, G., Pérez-laorga, E., Gonzalez, E., Ortiz, A., Lencina, J., Rovia, J., Marco, M., 2013. Comportamiento de dispersión y capacidad de vuelo a larga distancia de *Monochamus galloprovincialis* (Olivier 1795), in: *Congresos Forestales*.
- Mayr, E., 1963. *Animal species and evolution*. xiv + 797 pp.
- McClure, M., 1990. Role of wind, birds, deer, and humans in the dispersal of hemlock woolly adelgid (Homoptera: Adelgidae). *Environ. Entomol.* 19, 36–43.
- Merckx, T., Dyck, H.V., Karlsson, B., Leimar, O., 2003. The evolution of movements and behaviour at boundaries in different landscapes: a common arena experiment with butterflies. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 270, 1815–1821. doi:10.1098/rspb.2003.2459
- Mole, S., Zera, A.J., 1993. Differential allocation of resources underlies the dispersal-reproduction trade-off in the wing-dimorphic cricket, *Gryllus rubens*. *Oecologia* 93, 121–127. doi:10.1007/BF00321201
- Mole, S., Zera, A.J., 1994. Differential resource consumption obviates a potential flight-fecundity trade-off in the sand cricket (*Gryllus firmus*). *Funct. Ecol.* 8, 573–580. doi:10.2307/2389917
- Morris, W.F., Pfister, C.A., Tuljapurkar, S., Haridas, C.V., Boggs, C.L., Boyce, M.S., Bruna, E.M., Church, D.R., Coulson, T., Doak, D.F., Forsyth, S., Gaillard, J.-M., Horvitz, C.C., Kalisz, S., Kendall, B.E., Knight, T.M., Lee, C.T., Menges, E.S., 2008. Longevity can buffer plant and animal populations against changing climatic variability. *Ecology* 89, 19–25. doi:10.1890/07-0774.1
- Mota, M.M., Braasch, H., Bravo, M.A., Penas, A.C., Burgermeister, W., Metge, K., Sousa, E., others, 1999. First report of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. *Nematology* 1, 727–734.
- Mota, M.M., Futai, K., Vieira, P., 2009. Pine Wilt Disease And The Pinewood Nematode, *Bursaphelenchus Xylophilus*, in: Ciancio, A., Mukerji, P.K.G. (Eds.), *Integrated Management of Fruit Crops Nematodes, Integrated Management of Plant Pests and Diseases*. Springer Netherlands, pp. 253–274.

- Naves, Camacho, S., De Sousa, E.M., Quartau, J.A., 2007. Transmission of the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* through feeding activity of *Monochamus galloprovincialis* (Col., Cerambycidae). *J. Appl. Entomol.* 131, 21–25. doi:10.1111/j.1439-0418.2006.01111.x
- Naves, P., de Sousa, E., Quartau, J. a., 2006. Reproductive traits of *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera: Cerambycidae) under laboratory conditions. *Bull. Entomol. Res.* 96, 289–294. doi:10.1079/BER2006422
- Naves, P., Kenis, M., Sousa, E., 2005. Parasitoids associated with *Monochamus galloprovincialis* (Oliv.)(Coleoptera: Cerambycidae) within the pine wilt nematode-affected zone in Portugal. *J. Pest Sci.* 78, 57–62.
- Naves, P.M., De Sousa, E.M., Quartau, J.A., 2006. Feeding and oviposition preferences of *Monochamus galloprovincialis* for certain conifers under laboratory conditions. *Entomol. Exp. Appl.* 120, 99–104. doi:10.1111/j.1570-7458.2006.00430.x
- Naves, P.M., De Sousa, E.M., Quartau, J.A., 2007. Winter dormancy of the pine sawyer *Monochamus galloprovincialis* (Col., Cerambycidae) in Portugal. *J. Appl. Entomol.* 131, 669–673. doi:10.1111/j.1439-0418.2007.01228.x
- Naves, P.M., Sousa, E., Rodrigues, J.M., 2008. Biology of *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera, Cerambycidae) in the pine wilt disease affected zone, Southern Portugal. *Silva Lusit.* 16, 133–148.
- Necibi, S., Linit, M.J., 1998. Effect of *Monochamus carolinensis* on *Bursaphelenchus xylophilus* dispersal stage formation. *J. Nematol.* 30, 246.
- Nedved, O., Windsor, D., 1994. Supercooling ability, fat and water contents in a diapausing tropical beetle, *Stenotarsus rotundus* (Coleoptera: Endomychidae). *Eur. J. Entomol.* 91, 307–307.
- Ogawa, S., Hagiwara, Y., 1980. Expansion of the pine infestation caused by pine wood nematodes. *Shinrin Boeki For. Pests* 29, 115–117.
- Økland, B., Skarpaas, O., Schroeder, M., Magnusson, C., Lindelöw, Å., Thunes, K., 2010. Is Eradication of the Pinewood Nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*) Likely? An Evaluation of Current Contingency Plans. *Risk Anal.* 30, 1424–1439. doi:10.1111/j.1539-6924.2010.01431.x
- Paaijmans, K.P., Heinig, R.L., Seliga, R.A., Blanford, J.I., Blanford, S., Murdock, C.C., Thomas, M.B., 2013. Temperature variation makes ectotherms more sensitive to climate change. *Glob. Change Biol.* 19, 2373–2380. doi:10.1111/gcb.12240
- Pajares, J.A., Ibeas, F., Diez, J.J., Gallego, D., 2004. Attractive responses by *Monochamus galloprovincialis* (Col., Cerambycidae) to host and bark beetle semiochemicals. *J. Appl. Entomol.* 128, 633–638.
- Parmesan, C., Yohe, G., 2003. A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature* 421, 37–42. doi:10.1038/nature01286

- Pérez, G., Díez, J.J., Ibeas, F., Pajares, J.A., 2008. Assessing pine wilt disease risk under a climate change scenario in Northwestern Spain, in: *Managing Forest Ecosystems: The Challenge of Climate Change*. Springer, pp. 269–282.
- Petavy, G., David, J.R., Gibert, P., Moreteau, B., 2001. Viability and rate of development at different temperatures in *Drosophila*: a comparison of constant and alternating thermal regimes. *J. Therm. Biol.* 26, 29–39. doi:10.1016/S0306-4565(00)00022-X
- Pimentel, D., 2002. *Biological invasions: economic and environmental costs of alien plant, animal, and microbe species*. CRC Press.
- Pimentel, D., Zuniga, R., Morrison, D., 2005. Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. *Ecol. Econ., Integrating Ecology and Economics in Control Bioinvasions IEECB S.I.* 52, 273–288. doi:10.1016/j.ecolecon.2004.10.002
- Pinheiro, J.C., Bates, D.M., 2000. *Mixed-effects models in S and S-PLUS*. Springer.
- Ragland, G.J., Kingsolver, J.G., 2008. The effect of fluctuating temperatures on ectotherm life-history traits: comparisons among geographic populations of *Wyeomyia smithii*. *Evol. Ecol. Res.* 10, 29.
- Ranius, T., 2006. Measuring the dispersal of saproxylic insects: a key characteristic for their conservation. *Popul. Ecol.* 48, 177–188. doi:10.1007/s10144-006-0262-3
- Ranius, T., Hedin, J., 2001. The dispersal rate of a beetle, *Osmoderma eremita*, living in tree hollows. *Oecologia* 126, 363–370. doi:10.1007/s004420000529
- Rankin, M.A., Burchsted, J.C.A., 1992. The cost of migration in insects. *Annu. Rev. Entomol.* 37, 533–559. doi:10.1146/annurev.en.37.010192.002533
- Raubenheimer, D., 1995. Problems with Ratio Analysis in Nutritional Studies. *Funct. Ecol.* 9, 21. doi:10.2307/2390086
- R development core team., 2013. *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria.
- Renault, D., Hance, T., Vannier, G., Vernon, P., 2003. Is body size an influential parameter in determining the duration of survival at low temperatures in *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera: Tenebrionidae)? *J. Zool.* 259, 381–388.
- Richard, R., Casas, J., 2009. Stochasticity and controllability of nutrient sources in foraging: host-feeding and egg resorption in parasitoids. *Ecol. Monogr.* 79, 465–483. doi:10.1890/08-1566.1
- Richardson, D.M., Pyšek, P., Rejmánek, M., Barbour, M.G., Panetta, F.D., West, C.J., 2000. Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions. *Divers. Distrib.* 6, 93–107.
- Robinet, C., Imbert, C.-E., Rousselet, J., Sauvard, D., Garcia, J., Goussard, F., Roques, A., 2012. Human-mediated long-distance jumps of the pine processionary moth in Europe. *Biol. Invasions* 14, 1557–1569. doi:10.1007/s10530-011-9979-9

- Robinet, C., Roques, A., Pan, H., Fang, G., Ye, J., Zhang, Y., Sun, J., 2009. Role of human-mediated dispersal in the spread of the pinewood nematode in China. *PLoS One* 4, e4646.
- Roff, D.A., 1990. The evolution of flightlessness in insects. *Ecol. Monogr.* 389–421.
- Ronce, O., 2007. How does it feel to be like a rolling stone? Ten questions about dispersal evolution. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 38, 231–253.
- Ruel, J.J., Ayres, M.P., 1999. Jensen's inequality predicts effects of environmental variation. *Trends Ecol. Evol.* 14, 361–366. doi:10.1016/S0169-5347(99)01664-X
- Schwartzberg, E.G., Jamieson, M.A., Raffa, K.F., Reich, P.B., Montgomery, R.A., Lindroth, R.L., 2014. Simulated climate warming alters phenological synchrony between an outbreak insect herbivore and host trees. *Oecologia* 175, 1041–1049. doi:10.1007/s00442-014-2960-4
- Senger, S.E., Roitberg, B.D., Thistlewood, H.M.A., 2007. Relative flight responses of *Rhagoletis indifferens* as influenced by crowding, sex, and resources. *Entomol. Exp. Appl.* 123, 91–100. doi:10.1111/j.1570-7458.2007.00529.x
- Shigesada, N., Kawasaki, K., 1997. *Biological invasions: theory and practice*. Oxford University Press.
- Shirai, Y., 1995. Longevity, flight ability and reproductive performance of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae), related to adult body size. *Res. Popul. Ecol.* 37, 269–277.
- Shirai, Y., Kosugi, Y., 2000. Flight activity of the smaller tea tortrix, *Adoxophyes honmai* (Lepidoptera: Tortricidae). *Appl. Entomol. Zool.* 35, 459–466.
- Smith, M.T., Bancroft, J., Li, G., Gao, R., Teale, S., 2001. Dispersal of *Anoplophora glabripennis* (Cerambycidae). *Environ. Entomol.* 30, 1036–1040. doi:10.1603/0046-225X-30.6.1036
- Soliman, T., Mourits, M.C.M., van der Werf, W., Hengeveld, G.M., Robinet, C., Lansink, A.G.J.M.O., 2012. Framework for Modelling Economic Impacts of Invasive Species, Applied to Pine Wood Nematode in Europe. *PLoS ONE* 7, e45505. doi:10.1371/journal.pone.0045505
- Solomon, S., 2007. *Climate change 2007-the physical science basis: Working group I contribution to the fourth assessment report of the IPCC*. Cambridge University Press.
- Sousa, E., Bonifácio, L., Pires, J., Penas, A.C., Mota, M., Bravo, M.A., Naves, P., 2001. *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda; Aphelenchoididae) associated with *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera; Cerambycidae) in Portugal. *Nematology* 3, 89–91. doi:10.1163/156854101300106937
- Stamps, W.T., Linit, M.J., 2001. Interaction of intrinsic and extrinsic chemical cues in the behaviour of *Bursaphelenchus xylophilus* (Aphelenchida: Aphelenchoididae) in relation to its beetle vectors. *Nematology* 3, 295–301.

- Stamps, W.T., Linit, M.J., others, 1998. Chemotactic response of propagative and dispersal forms of the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* to beetle and pine derived compounds. *Fundam. Appl. Nematol.* 21, 243–250.
- Stevens, D.J., Hansell, M.H., Monaghan, P., 2000. Developmental trade-offs and life histories: strategic allocation of resources in caddis flies. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 267, 1511–1515. doi:10.1098/rspb.2000.1172
- Takasu, F., Yamamoto, N., Kawasaki, K., Togashi, K., Kishi, Y., Shigesada, N., 2000. Modeling the expansion of an introduced tree disease. *Biol. Invasions* 2, 141–150.
- Tammaru, T., Haukioja, E., 1996. Capital breeders and income breeders among Lepidoptera: consequences to population dynamics. *Oikos* 561–564.
- Taylor, L.R., 1963. Analysis of the effect of temperature on insects in flight. *J. Anim. Ecol.* 99–117.
- Taylor, R. a. J., Bauer, L.S., Poland, T.M., Windell, K.N., 2010. Flight Performance of *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae) on a Flight Mill and in Free Flight. *J. Insect Behav.* 23, 128–148. doi:10.1007/s10905-010-9202-3
- Terblanche, J.S., Nyamukondiwa, C., Kleynhans, E., 2010. Thermal variability alters climatic stress resistance and plastic responses in a globally invasive pest, the Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*). *Entomol. Exp. Appl.* 137, 304–315. doi:10.1111/j.1570-7458.2010.01067.x
- Thompson, R.M., Beardall, J., Beringer, J., Grace, M., Sardina, P., 2013. Means and extremes: building variability into community-level climate change experiments. *Ecol. Lett.* 16, 799–806. doi:10.1111/ele.12095
- Togashi, K., 1990a. Life table for *Monochamus alternatus* (Coleoptera, Cerambycidae) within dead trees of *Pinus thunbergii*. *Jpn. J. Entomol.* 58, 217–230.
- Togashi, K., 1990b. A field experiment on dispersal of newly emerged adults of *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Res. Popul. Ecol.* 32, 1–13.
- Togashi, K., Shigesada, N., 2006. Spread of the pinewood nematode vectored by the Japanese pine sawyer: modeling and analytical approaches. *Popul. Ecol.* 48, 271–283. doi:10.1007/s10144-006-0011-7
- Tomminnen, J., 1993. Development of *Monochamus galloprovincialis* Olivier (Coleoptera, Cerambycidae) in cut trees of young pines (*Pinus sylvestris* L.) and log bolts in southern Finland. *Entomol. Fenn.* 4, 137–142.
- Van Dyck, H., Baguette, M., 2005. Dispersal behaviour in fragmented landscapes: Routine or special movements? *Basic Appl. Ecol.* 6, 535–545. doi:10.1016/j.baae.2005.03.005
- Van Dyck, H., Matthysen, E., 1999. Habitat fragmentation and insect flight: a changing “design” in a changing landscape? *Trends Ecol. Evol.* 14, 172–174.
- Van Noordwijk, A.J., de Jong, G., 1986. Acquisition and allocation of resources: their influence on variation in life history tactics. *Am. Nat.* 137–142.

- Vasseur, D.A., DeLong, J.P., Gilbert, B., Greig, H.S., Harley, C.D.G., McCann, K.S., Savage, V., Tunney, T.D., O'Connor, M.I., 2014. Increased temperature variation poses a greater risk to species than climate warming. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 281, 20132612. doi:10.1098/rspb.2013.2612
- Vitousek, P.M., D'Antonio, C.M., Loope, L.L., Westbrooks, R., 1996. Biological invasions as global environmental change. *Am. Sci.* 84, 468–478.
- Vogt, J.T., Appel, A.G., S West, M., 2000. Flight energetics and dispersal capability of the fire ant, *Solenopsis invicta* Buren. *J. Insect Physiol.* 46, 697–707.
- Walters, K.E.A., Dixon, A.F.G., 1983. Migratory urge and reproductive investment in aphids: variation within clones. *Oecologia* 58, 70–75.
- Walther, G.-R., Roques, A., Hulme, P.E., Sykes, M.T., Pyšek, P., Kühn, I., Zobel, M., Bacher, S., Botta-Dukát, Z., Bugmann, H., Czúcz, B., Dauber, J., Hickler, T., Jarošík, V., Kenis, M., Klotz, S., Minchin, D., Moora, M., Nentwig, W., Ott, J., Panov, V.E., Reineking, B., Robinet, C., Semenchenko, V., Solarz, W., Thuiller, W., Vilà, M., Vohland, K., Settele, J., 2009. Alien species in a warmer world: risks and opportunities. *Trends Ecol. Evol.* 24, 686–693. doi:10.1016/j.tree.2009.06.008
- Wang, X.-G., Johnson, M.W., Daane, K.M., Nadel, H., 2009. High Summer Temperatures Affect the Survival and Reproduction of Olive Fruit Fly (Diptera: Tephritidae). *Environ. Entomol.* 38, 1496–1504. doi:10.1603/022.038.0518
- Wessels, F.J., Jordan, D.C., Hahn, D.A., 2010. Allocation from capital and income sources to reproduction shift from first to second clutch in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *J. Insect Physiol.* 56, 1269–1274. doi:10.1016/j.jinsphys.2010.03.033
- Wheeler, D., 1996. The role of nourishment in oogenesis. *Annu. Rev. Entomol.* 41, 407–431.
- Whitmire, S.L., Tobin, P.C., 2006. Persistence of invading gypsy moth populations in the United States. *Oecologia* 147, 230–237.
- Wilcove, D.S., Rothstein, D., Dubow, J., Phillips, A., Losos, E., 1998. Quantifying Threats to Imperiled Species in the United States. *BioScience* 48, 607–615. doi:10.2307/1313420
- Yamamura, K., Kishita, M., Arakaki, N., Kawamura, F., Sadoyama, Y., 2003. Estimation of dispersal distance by mark-recapture experiments using traps: correction of bias caused by the artificial removal by traps. *Popul. Ecol.* 45, 149–155.
- Yamanaka, T., Tatsuki, S., Shimada, M., 2001. Flight characteristics and dispersal patterns of fall webworm (Lepidoptera: Arctiidae) males. *Environ. Entomol.* 30, 1150–1157.
- Yi, C.K., Byun, B.H., Park, J.D., Yang, S.I., Chang, K.H., 1989. First finding of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhrer) Nickle and its insect vector in Korea. *Res. Rep. For. Res. Inst. Seoul* 141–149.
- Yukilevich, R., 2005. Dispersal evolution in fragmented habitats: the interplay between the tendency and the ability to disperse. *Evol. Ecol. Res.* 7, 973–992.

- Zera, A.J., 2005. Intermediary Metabolism and Life History Trade-offs: Lipid Metabolism in Lines of the Wing-polymorphic Cricket, *Gryllus firmus*, Selected for Flight Capability vs. Early Age Reproduction. *Integr. Comp. Biol.* 45, 511–524. doi:10.1093/icb/45.3.511
- Zera, A.J., Denno, R.F., 1997. Physiology and ecology of dispersal polymorphism in insects. *Annu. Rev. Entomol.* 42, 207–230. doi:10.1146/annurev.ento.42.1.207
- Zera, A.J., Harshman, L.G., 2001. The Physiology of Life History Trade-Offs in Animals. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 32, 95–126.
- Zhao, L., Lu, M., Niu, H., Fang, G., Zhang, S., Sun, J., 2013a. A native fungal symbiont facilitates the prevalence and development of an invasive pathogen-native vector symbiosis. *Ecology* 94, 2817–2826.
- Zhao, L., Mota, M., Vieira, P., Butcher, R.A., Sun, J., 2014. Interspecific communication between pinewood nematode, its insect vector, and associated microbes. *Trends Parasitol.* 30, 299–308.
- Zhao, L., Zhang, S., Wei, W., Hao, H., Zhang, B., Butcher, R.A., Sun, J., 2013b. Chemical Signals Synchronize the Life Cycles of a Plant-Parasitic Nematode and Its Vector Beetle. *Curr. Biol.* 23, 2038–2043.
- Zuur, A., Ieno, E.N., Walker, N., Saveliev, A.A., Smith, G.M., 2009. Mixed effects models and extensions in ecology with R. Springer.

Annexe 1

How does sex and maturation status influence host recognition by *Monochamus galloprovincialis*?

Authors: Brice Giffard^{1,2,3}, Guillaume David^{1,2}, Benjamin Joubard³, Dominique Piou^{1,2,4}, Hervé Jactel^{1,2}

1. Abstract

Finding host plant for feeding and reproduction is crucial for herbivorous insects. Host plant selection has large consequences on the fitness of the insect and its localisation using visual and olfactory cues is a key process for phytophagous insects. Models mimicking the visual characteristics of host plant may be useful tools for highlighting behavioural responses of insects, and disentangling the importance of visual or chemical cues. Using dummy pines and an olfactometer, this study aimed to assess the importance of olfactory cues for the localisation of its host plant, *Pinus pinaster*, by *Monochamus galloprovincialis*. Insects of different sexes and maturation status were compared for their responses to a dummy vs. a real pine, and secondly to two dummy pines with one hiding a real branch, in order to measure their response to olfactory cues combined with a mimicking host plant. In a third experiment, insects were tested in a 4-way olfactometer to evaluate the effect of single olfactory cues (pine odours or not). Immature females were significantly attracted by single olfactory cues and showed different responses than the three other groups (immature males, mature females and males). Indeed, the other groups are sensible to the combination of visual and olfactory cues, highlighted by their significant choice towards real pines. Both the maturation status and the sex have influenced the response to olfactory and visual cues, then complicating the possible using of an efficient trapping of these insects, in relation with the risk of pine wood nematode inoculation.

Keywords: Olfactometer; cues; behaviour; beetle; pine wood nematode; foraging

2. Introduction

Finding host plants is crucial for herbivorous insects (Awmack and Leather 2002) as it is conditional on several processes such as nutrition and reproduction and has therefore large consequences on fitness (Prokopy and Owens 1983; Finch and Collier 2000). When searching for distant host resources, many insects use both olfactory and visual cues. These stimuli may act in concert or successively during the approach to the plant by an insect (Rojas and Wyatt 1999, Finch and Collier 2000). Visual cues used by insects to localise their host plants are multiple: plant size, shape, temperature, or colours (including UVs), and they are often used at large distances (Prokopy and Owens 1983). However, visual cues are rarely specific to a particular host plant (Finch and Collier 2000). Plant odour plumes are usually more plant specific and can influence insect behaviours for various purposes, such as attracting herbivores towards food plants or sites for egg deposition (Beyaert and Hilker 2014). The spatial scales at which olfactory cues are prevalent still remain controversial but they seem to act mostly at local scale (Finch and Collier 2000; Giffard et al. 2012), within the host plant habitat (Aluja and Prokopy 1993).

Host selection and colonization of Cerambycidae is relatively similar to that in bark beetles (Scolytidae), i.e. phases of dispersal, selection, concentration, and establishment (Allison et al. 2004). The phase of concentration is not or less applicable to the Cerambycidae, so most of the studies focused on the selection phase of the host colonization. When searching for a host tree, beetles respond to an array of stimuli, including tree silhouette or tree odour (Finch and Collier 2000), and especially evaluate the presence of hosts and non-hosts during their foraging (Campbell and Borden 2009). Linsley (1959) suggested that the dominant stimuli used by longhorn beetles (Cerambycidae) for host seeking is olfaction, with adult beetles responding to host-related volatiles (Allison et al. 2004). They are also attracted by pheromones released by earlier colonisers of the host trees such as bark beetles (Morewood et al. 2002). However, this type of attraction seems more relevant to adult longhorn beetles that are already sexually mature, have mated and search for declining trees where to lay eggs (Allison et al. 2004). So far, most researches on the chemical and visual ecology of *Monochamus* species focused on this particular phase of their life cycle, studying the role of pine volatile organic compounds (VOCs) and/or scolytid pheromones during the search of sexual partners and oviposition sites (Allison et al. 2004).

Beetles of the genus *Monochamus* (Coleoptera: Cerambycidae) are of particular importance since the adults are vectors of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhrer) Nickle. Native to North America, this nematode is responsible for important mortalities of local pine species in each region of introduction (Togashi and Shigesada 2006; Soliman et al 2012). Nematodes are rapidly spreading through the vascular system and resin canals, and blocking water conductance in the xylem (Vicente et al 2012). As a result, tree physiological processes are disrupted, leading to a rapid wilt of the pine needles and tree death in less than 3 months (Kuroda 2008). The spread of the nematode and the subsequent “pine wilt disease” are therefore mostly dependent on the host plant localization by infected *Monochamus* at earlier stages of their life. The transmission of the disease to healthy trees occurs during the insect emergence and maturation phase, needing live pine branches to feed and then increasing transmission probability (Sousa et al. 2001; Naves et al. 2007).

Monochamus species are long-living insects. *Monochamus galloprovincialis*, European vector of pine wood nematode, has an average longevity of 90 days (Naves et al. 2007). The recent identification of the male pheromone of *M. galloprovincialis*, associated with bark beetle semiochemicals, has given rise to the idea of an effective control of this beetle by mass trapping in outbreak situations, associated with pine wood nematode spread (Pajares et al. 2010). Much fewer studies addressed the question of host finding cues in immature *Monochamus* beetles. The behavioural response of the insects can greatly vary between individuals, and the evaluation of the response variation within a species between sexes or maturation status is then one of the prerequisite to develop integrated pest management tools. Ontogenetic shifts in host plant preference or in cues used for host recognition do exist and have been detected in different beetle species (Janz et al. 2005; Radžiute and Būda 2013) and within taxonomic groups between sexes (see for example Cabrera Walsh et al. 2014). Ontogenetic effects on the responses to host volatiles have been observed in flight and walking responses of male and female *M. alternatus* and *Phoracantha semipunctata* to host volatiles (Barata and Araújo 2001). Moreover, Ikeda et al. (1981) showed that young females (10 mm of width x height) were materialised with white marks on the floor and walls, in the left and right corners of the room. One pine, either natural or dummy, was placed in each area. Insects were placed individually on the ground in the centre of the room at the opposite of the two corners with pines. To acclimatize with ambient conditions, they were placed 10 minutes in a

plastic box in the room, before the start of the test. The room was completely ventilated between each test to evacuate pine odours.

We used six different natural pine trees in the tests. Potted pines were 2-years old and of ca. 150 cm height, with same genetic origin and growth conditions. They were sprayed with insecticide 1 month before the beginning of the experiment in order to avoid any insect damage that might cause the emission of VOCs. We also used commercial plastic pines (hereafter called dummy) of the same height (150 cm), and with similar shape and colour than real pines.

2.1. Olfactometer

The insect response to olfactive stimuli only, i.e. pine odours, was measured using a 4-way olfactometer with a central chamber of 11 cm in diameter, based on the design described by Vet et al. (1983). Four "choice areas" were delimited near the entrance of the four arms. Insect were considered having made a choice during the time they spent in a particular area. We first tested for possible bias due to unequal light or air flow intensities between the four areas using 16 insects (female and male, young and mature insects: $n = 4$ by category) with air flows without odours (air flows of $1\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ cleaned by granular activated charcoal). Using Generalized Linear Models (GLM) and analysing the time spent in each of the four areas and the number of entrances (see the section of Statistical analyses), we found any significant effect of flow ($\chi^2 = 2.03$, $df = 3$, $P = 0.57$ and $\chi^2 = 1.55$, $df = 3$, $P = 0.67$, respectively) or direction ($\chi^2 = 4.19$, $df = 3$, $P = 0.24$ and $\chi^2 = 0.98$, $df = 3$, $P = 0.81$, respectively), indicating no choice of particular direction by control insects, and no light or inclination variations between the four exit areas of the olfactometer. For each of these tests ($n = 16$) and the experiment with pine odours ($n = 60$), temperature and air relative humidity were maintained in the olfactometer room at $T = 25.0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.1$ and $\text{RH} = 59.2\text{ \%} \pm 0.5$.

M. alternatus were less sensitive to α -pinene than males of the same age whereas the opposite was true for mature beetles. An interesting study also showed that *M. scutellatus* were captured in traps baited with host volatiles irrespective of their design early in the flight season (i.e. during the period of maturation feeding) whereas they mostly responded to baited traps presenting a prominent and dark silhouette, later in the season, i.e., during the oviposition period (Morewood et al. 2002). Such results suggest that both visual and olfactive

cues could be used by *Monochamus* beetles to locate their host plants but very few studies have analysed how their respective role might vary across age and between sexes.

Models mimicking the visual characteristics of plant or plant structures, i.e., “dummy plants”, have been successfully used to disentangle the relative effects of visual or chemical cues on host finding behaviour in insects (Rojas and Wyatt 1999, Brévault and Quicili 2007, Paiva et al. 2011).

We followed this approach to compare the percentage of *M. galloprovincialis* beetles, male or female, immature or mature, able to reach natural or dummy pine trees of the same size and shape, in large experimental chambers. Then we compared the probability of finding dummy trees with vs. without a dispenser of pine needles volatiles to confirm the role of olfactory cues. These behavioural experiments were made in large climatic chambers allowing insect to walk or fly towards the potted trees. They were completed with olfactometer experiments to better assess chemical cues.

3. Methods

3.1. *Beetles rearing*

Immature *M. galloprovincialis* were obtained from fresh deadwood of *Pinus pinaster*, collected in maritime pine plantations near Cestas, France (44° 44' 43" N; 0° 40' 52" W) in January and February 2012. Logs were stored in a climatic chamber until beetles emerged (temperature $21 \pm 1^\circ\text{C}$ and L:D 16:8 h photoperiod). Newly emerged insects were collected daily, and their sex and length of their right elytron were recorded. A part of them was immediately used in behavioural tests (hereafter named as “immature”). The other part was fed ad libitum with fresh pine until they completed their maturation feeding (hereafter named as “mature”), i.e. for at least 30 days (Naves et al. 2006). Beetles were kept in plastic boxes ($35 \times 45 \times 24$ cm), with a maximum of 10 beetles per box of the same sex to avoid mating (see more details in David et al. 2014), in a climatic chamber (temperature $21 \pm 1^\circ\text{C}$ and L:D 16:8 h photoperiod).

3.2. Behavioural trials

Large climatic chambers

Due to the large size of *M. Galloprovincialis* (mean elytron length \pm SE = 12.4 ± 0.2 mm, $n = 120$), and to allow natural movements such as walk and flight, we used a large climatic chamber of $6 \times 4 \times 2$ m (length \times width \times height) for the two behavioural experiments. An electric fan was placed in the middle of the room and used to regulate air temperature (mean \pm SE = $25.0^\circ\text{C} \pm 0.1$) and relative humidity ($59.8\% \pm 0.4$). Two areas of $1 \times 1 \times 2$ m (length \times width \times height) were materialised with white marks on the floor and walls, in the left and right corners of the room. One pine, either natural or dummy, was placed in each area. Insects were placed individually on the ground in the centre of the room at the opposite of the two corners with pines. To acclimatize with ambient conditions, they were placed 10 minutes in a plastic box in the room, before the start of the test. The room was completely ventilated between each test to evacuate pine odours.

We used six different natural pine trees in the tests. Potted pines were 2-years old and of ca. 150 cm height, with same genetic origin and growth conditions. They were sprayed with insecticide 1 month before the beginning of the experiment in order to avoid any insect damage that might cause the emission of VOCs. We also used commercial plastic pines (hereafter called dummy) of the same height (150 cm), and with similar shape and colour than real pines.

3.1. Olfactometer

The insect response to olfactive stimuli only, i.e. pine odours, was measured using a 4-way olfactometer with a central chamber of 11 cm in diameter, based on the design described by Vet et al. (1983). Four "choice areas" were delimited near the entrance of the four arms. Insects were considered having made a choice during the time they spent in a particular area. We first tested for possible bias due to unequal light or air flow intensities between the four areas using 16 insects (female and male, young and mature insects: $n = 4$ by category) with air flows without odours (air flows of $1\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ cleaned by granular activated charcoal). Using Generalized Linear Models (GLM) and analysing the time spent in each of the four areas and the number of entrances (see the section of Statistical analyses), we found any significant effect of flow ($\chi^2 = 2.03$, $df = 3$, $P = 0.57$ and $\chi^2 = 1.55$, $df = 3$, $P = 0.67$,

respectively) or direction ($\chi^2 = 4.19$, $df = 3$, $P = 0.24$ and $\chi^2 = 0.98$, $df = 3$, $P = 0.81$, respectively), indicating no choice of particular direction by control insects, and no light or inclination variations between the four exit areas of the olfactometer. For each of these tests ($n = 16$) and the experiment with pine odours ($n = 60$), temperature and air relative humidity were maintained in the olfactometer room at $T = 25.0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.1$ and $\text{RH} = 59.2\% \pm 0.5$.

3.1. Trials

Room experiment 1: real vs. dummy pine

We first tested whether insects were attracted by pine trees and if they preferred a real pine over a dummy tree. Dummy and real pines were alternatively placed in the left or right corner of the climatic chamber (real pines were placed 31 times in the right corners out of 60 tests). 6 real pines have been used during the 60 tests and alternatively used in the chamber (10 tests per tree). Sex (male vs. female) and maturation status (immature vs. mature) factors were crossed in a complete factorial design with 15 replicates ($n = 15$ individuals per group). Each insect was tested for 30 minutes. We recorded how many times insects entered in the area of the real vs. dummy pine, and the time spent in each area (hereafter named as “choice area”). All tests were monitored by the same person (BG) to avoid any observer effect.

Room experiment 2: dummy pine with dummy branch vs. dummy pine with hidden branch

In a second series of tests, we tested the sole effect of pine odour. We used two dummy trees, placing one in each room corner. In one of the two dummy pines, we attached a real branch of maritime pine to allow the diffusion of VOCs but covered it with white tulle net to mask its visual appearance. A dummy branch of pine was also covered with tulle net and placed in the opposite dummy tree to control for a potential effect of the tulle net. The positions of dummy pines with vs. without a real branch were permuted at each test. The same complete factorial design crossing sex and maturation status factors was used with 15 replicates. Insects were manipulated and observed as in experiment 1.

Olfactometer experiment

We sampled two branches from the pines used in the room experiment. We put them in glass bottles (1 L) to release pine odours into two of the four air flows (four arms) of the olfactometer. As control flows, we used two empty glass bottles (same volume of 1 L). The two air flows with pine odours faced opposite and were orthogonal to the two control air flows. At each test, the composition of the air flow was permuted. Each insect was placed in the olfactometer the following half-day after it has been tested in the second room experiment. Each individual beetle was placed for 30 minutes in the 4-way olfactometer. Insect movements were recorded by a video camera and analysed by a single operator (BJ). The number of entrance and the time spent into each exit area of the olfactometer was recorded and summed per type of air flow (pine odours vs. control flows).

3.1. Statistical analyses

The two response variables were a “time” variable, i.e., the time spent in a choice area, and the number of entrances in a choice area, for the three experiments. These two variables were then defined as matched pair of counts: each data was defined by the two values of the time spent, or the number of entrances, in the two different areas, and bound into a single object per insect. They were analysed as proportion data using a GLM with binomial errors and logit link (Crawley 2013). Overdispersion was checked by comparing the residual deviance and the residual degrees of freedom. Whereas the entrance number showed slight differences between residual deviance and residual degrees of freedom, the “time” variable showed clearly large overdispersion and a quasibinomial family was then applied.

This type of analyses differs from χ^2 tests, traditionally used for choice test experiments, and allows testing for interactive effects of sex and maturation status (immature vs. mature) in a single model. Differences among the four groups of insects (immature females, mature females, immature males and mature males) were assessed by contrast analyses, using parameter estimates and their standard errors.

Additionally, we tested for differences in behaviour between the different sexes and maturation status by analysing the time spent with no activities (separately in the three experiments) and the number of flights (only for the room experiments): these variables were respectively analysed using quasipoisson (overdispersed variable) and poisson GLMs, adapted for these two types of count data.

All statistical analyses were carried out in the R statistical environment (R Core Team 2013).

4. Results

4.1. *Flight number and time with no activities*

We found no significant effect of sex, maturation status or their interactive effect on the time spent with no activities ($\chi^2 = 1.28$, $\chi^2 = 3.09$ and $\chi^2 = 0.14$, all $df = 1$ and all $P > 0.07$, respectively) and the number of flights ($\chi^2 = 0.26$, $\chi^2 = 0.73$ and $\chi^2 = 1.15$, all $df = 1$ and all $P > 0.28$, respectively), in the first room experiment. We found the same results in the second room experiment for the number of flights (sex: $\chi^2 = 0.01$, maturation: $\chi^2 = 1.35$ and sex \times maturation: $\chi^2 = 0.40$, all $df = 1$ and all $P > 0.24$, respectively) but immature beetles spent significantly less time with no activities than the mature ones, whatever their sexes ($\chi^2 = 22.11$, $df = 1$, $P < 0.001$, other effects of sex and interactive term non-significant: $\chi^2 = 0.10$ and $\chi^2 = 0.04$, all $df = 1$ and all $P > 0.75$, respectively). We also found no difference of insect behaviour in the olfactometer experiment: The time spent with no activities in the olfactometer was not either affected by sex, maturation status or interactive term ($\chi^2 = 0.01$, $\chi^2 = 0.95$ and $\chi^2 = 1.59$, all $df = 1$ and all $P > 0.20$, respectively).

4.2. *Differences between response variables in insect responses (all individuals)*

In the two room experiments, insects significantly choose the treatment with real pine odours when comparing the time spent in the two areas (Figure 1). Our results showed that all insects ($n=60$) have first chosen to spend time in the area with the real pine vs. the area with the dummy pine (Table 1 and Figure 1), and in the second experiment ($n=60$), that they have chosen to spend time in the area with the dummy pine with a real branch of pine hidden than in the area with the dummy pine with a dummy pine hidden (Table 1).

The results are slightly different when we analysed the number of entrances between the two areas, especially in the room experiment 1. We found 8 significant results for 15 tests when we analysed the “time” variable (Table 1 and Figure 1), whereas we found only 4 significant results when we analysed the variable “number of entrances” (Table 2). Nevertheless, all these 4 results are consistent with those found for the “time” variable, but,

surprisingly, it was only in the first experiment that the significance (but not the direction of the choice – see Estimates in the Table 2) has varied between the two variables analysed, i.e., when we compared the choice response of beetles between a dummy pine and a real pine.

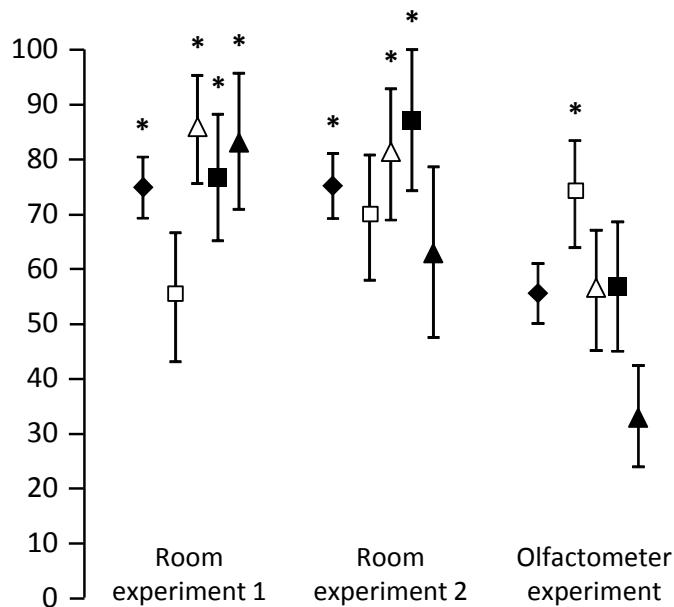


Fig. 1 Mean choice percentages (\pm SE) of beetles concerning the time spent in the area with a real pine (room experiment 1), the area with a real pine branch (room experiment 2) and the olfactometer exits with pine odour (olfactometer experiment). Mean values are shown for all individuals ($n=60$; filled diamonds) and then for each group tested ($n = 15$ individuals per group), i.e., immature females (empty squares), immature males (empty triangles), mature females (filled squares) and mature males (filled triangles). Percentage values superior to 50 % indicate that insects have chosen towards the real pine, branch or pine odour exits. Significant percentage values (different from 50%) are indicated with an asterisk above positive SE (see details in Results section and Table 1).

4.3. *Insect responses differ with the maturation status and the sex*

Beyond the general response of all tested insects, we did find strong differences between the different groups of insects tested in our experiments. Immature males and mature females showed a clear positive response to the presence of a real pine in the first experiment or a real branch in the second room experiment (Table 1 and Figure 1). Their response in the olfactometer was oriented towards the pine odours as well, even if this trend was not

significant (Table 1 and Figure 1). Their response in the experiment 2 is consistent with a significant and strong positive response to the presence of a hidden real branch (Figure 1).

Mature males showed similar responses as immature males for their use of a combination of visual and olfactory cues (experiment 1 – Table 1 and Figure 1). However, we did not find a similar significant choice of this group to the presence of a real pine branch hidden in a dummy pine (experiment 2), suggesting that they were attracted when both visual and olfactory cues were combined. The response observed for this group in the olfactometer is consistent with this result, with a negative but non-significant effect of pine odour (only on the variable “time” – Table 1).

Surprisingly, immature female beetles showed a clear different response to treatments than the three other groups (Table 1 and Figure 1). They did not significantly choose the real pine or the real branch in the two room experiments, even if they did not choose the dummy branch or pine either (Tables 1 or 2). The most surprising result was that despite this behaviour in the two room experiments, immature female beetles significantly choose the exits with pine odours in the olfactometer experiment, whatever the response variable (time and number of entrances, Tables 1 and 2, Figure 1).

Table 1 Summary of the results of generalised linear models on the time spent in the real pine vs. the dummy pine areas, the real branch vs. the dummy branch areas (room experiments) and the odour pine vs. no odour exits (olfactometer). Results are given first for all individuals pooled and per group (immature females, immature males, mature females, and mature males). First lines present the estimate \pm SE of the effect and associated t-values (within parentheses). Second lines present choice percentage \pm SE. Positive estimates and % values superior to 50% indicate that insects have made a choice towards the real pine, branch or pine odour. Significant t-values and percentages are in bold characters (*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$).

Variable : Time spent in the choice area	Immatures			Matures	
	All individuals (n = 60)	Females (n=15)	Males (n=15)	Females (n=15)	Males (n=15)
Real pine vs. Dummy pine	1.09 \pm 0.28 (3.94***) 75 \pm 6%	0.19 \pm 0.47 (0.41) 55 \pm 12%	1.77 \pm 0.64 (2.77**) 86 \pm 10%	1.19 \pm 0.57 (2.11*) 77 \pm 12%	1.61 \pm 0.72 (2.24*) 83 \pm 12%
Real branch vs. Dummy branch	1.10 \pm 0.30 (3.74***) 75 \pm 6%	0.82 \pm 0.50 (1.65) 69 \pm 11%	1.45 \pm 0.65 (2.23*) 81 \pm 12%	1.91 \pm 0.85 (2.24*) 87 \pm 13%	0.54 \pm 0.64 (0.40) 63 \pm 16%
Pine odour vs. No odour	0.22 \pm 0.22 (1.00) 55 \pm 5%	1.03 \pm 0.46 (2.25*) 74 \pm 10%	0.25 \pm 0.44 (0.57) 56 \pm 11%	0.27 \pm 0.47 (0.58) 57 \pm 12%	-0.70 \pm 0.46 (- 1.54) 33 \pm 9%

Table 2 Summary of the results of generalised linear models on the number of entrances in the real pine vs. the dummy pine areas, the real branch vs. the dummy branch areas (room experiments) and the odour pine vs. no odour exits(olfactometer). Results are given first for all individuals pooled and per group (immature females, immature males, mature females, and mature males). First lines present the estimate \pm SE of the effect and associated z-values (within parentheses). Second lines present choice percentage \pm SE. Positive estimates and % values superior to 50% indicate that insects have made a choice towards the real pine, branch or pine odour. Significant z-values and percentages are in bold characters (*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$).

Variable :					
Number of entrances in the choice area	Immatures			Matures	
	All individuals (n = 60)	Females(n=15)	Males(n=15)	Females(n=15)	Males(n=15)
Real pine vs. Dummy pine	0.30 \pm 0.20 (1.49) 57 \pm 5%	0.15 \pm 0.39 (0.70)	0.19 \pm 0.36 (0.54)	0.32 \pm 0.46 (0.69)	0.58 \pm 0.42 (1.38)
Real branch vs. Dummy branch	0.69 \pm 0.21 (3.25**)	0.43 \pm 0.36 (1.21)	1.10 \pm 0.47 (2.33*)	1.10 \pm 0.47 (2.33*)	0.22 \pm 0.47 (0.47)
Pine odour vs. No odour	0.08 \pm 0.08 (0.98) 52 \pm 2%	0.37 \pm 0.13 (2.92**)	-0.25 \pm 0.14 (- 1.76)	-0.29 \pm 0.27 (- 1.07)	0.22 \pm 0.21 (1.05)

5. Discussion

Our global results showed a clear and expected behavioural response of all the insects tested to our experimental conditions. Whatever their sexes or maturation status, the combination of both visual and olfactive cues led to a choice of insects towards the real pine or the dummy pine with a real branch. Insects often use a combination of visual and olfactive cues to locate their host (Campbell and Borden 2009), even if our experiment was not designed to disentangle the spatial scale at which they influence (Finch and Collier 2000). The olfactometer experiment with only a pine odour proposed showed a positive but non-significant attractive effect. This result shows that such experiments for long-life insects may be of difficult use to demonstrate the stimuli used to locate their host plant for these large insects, for example using flights to reach their host plant.

When analysing their response by maturation status and sex, and especially through the use of binomial Generalized Linear Model which allow us such comparisons, we found large differences between groups. Immature females showed a clear and positive response to single olfactive cues. During our experiment, even if immatures males and matures females presented a behaviour consistent with our hypotheses, the two other groups showed different responses, and especially immatures females which may use firstly odour cues to locate their hosts when emerging. Our results are consistent with a previous study (Barata and Araújo 2001) where behavioural responses of females of *Phoracantha semipunctata* to host-tree odour seemed depend on sexual maturity. In the same way, even if our matures males showed a quite different response from immatures ones, the effect of sexual maturity did not apply for males, maybe due to the fact that they are sexually mature and can immediately inseminate females after emergence (Naves et al. 2006). Thus, several days after maturation feeding, a shift in physiological state can occur, and especially for females which have matured their eggs, and then attracted by odour from stressed-trees more suitable for larval development (consistent with our modalities of pine odours in our second experiment in large chambers and in the olfactometer where we used cut branches). Females are more sensitive to olfactive cues at the emergence because they need an important resource income to sustain egg production. At the opposite, they can be sensitive to other cues, not tested in our experiment, searching for egg deposition sites. Similarly, in natural conditions, *M. scutellatus* were apparently more attracted by crossvane traps with large dark silhouettes that would have

mimicked large trunks and associated preferred oviposition sites in the latter half of the flight season, and this corresponds to the period when the majority of the population is sexually mature (Morewood et al. 2002). Early in the season, when a large proportion of the population is sexually immature, any effect of the trap type has been shown (Morewood et al. 2002).

Secondly, one possible effect and limitation of our study is that the adults used for the experiments were laboratory-reared during 30 days. Though we placed them without pine branches during 24 hours before experiment, they were not naïve and their behaviour might be different from immatures insects and wild beetles (Alagarmalai et al. 2009). However, immature males and matures females showed globally similar responses whatever their sex. Furthermore, the reproduction status of our mature insects could explain the different response observed. Males and females were reared separately but this could have modified the behavioural response of the mature individuals. Finally, another explanation could be the handling stress that newly-emerged insects were subjected to (while being collected, sexed, measured and weighed), which, although short in duration and equal for all insects, may have had greater impact on immature insects than on mature ones (regularly handled during their rearing).

A common feature of models of host choice is that they typically assume an all-or-none response; insects should either accept or reject all plants from a given category, but there should be no intermediate responses. Females can for example oviposit on a lower-ranked plant in simultaneous choice trials, even when there is a higher-ranked plant available (Janz et al. 2005).

We have chosen to use large chambers for our experiments: *Monochamus* insects then flew and walked all over the room during 30 minutes which introduced a large variability of behaviours between groups and between insects. Previous studies on a female butterfly behaviour searching for its oviposition site showed that oviposition cannot simply be an all-or-none decision and could be “adjusted during the female’s life time by learning or motivation” (Janz and Thompson 2002; Janz et al. 2005). We can expect such behaviour for our beetles which may present important variations for their physiological status even within the same group (such as flight capacities, see David et al. 2014).

Using different variable responses in our experiments, we also showed the difficulty to highlight such fine behavioural responses in controlled experiments. Indeed, one of our results is the contrasted observed response when analysing the time spent or the number of entrances in the control and choice areas (see the first paragraph of the Results section). The different responses of our two variables may be due to the fact that the description of host behaviour recognition for large insects is difficult to study both experimentally and in the field (Knolhoff and Heckel2014). For our study, we consequently chose to create an experimental chamber which made it possible to explore the effects of choice for *Monochamus galloprovincialis* while letting them be free of their flight or walks along the room. We consequently observed important explorative phases of environment by *Monochamus* individuals, even for mature insects. Some of them flew several times during the experiment time in the room and few spent all their time motionless, with large variations between individuals which led to difficulties to an interpretation of behavioural response for the whole species (Knolhoff and Heckel2014). However, we found few differences of the number of flights or the time without activities between groups, although a slight but significant increase of the time motionless for matures insects (mean of ca. 457 seconds) compared to immatures insects (ca. 434 seconds) during the second experiment. A lot of insects entered many times in the two choice areas in the two room experiments before they stay or spend some time near or in the real pine or near the real branch. Same observations have been done in the olfactometer experiment with numerous entrances in all exits. With this large chamber experiment, the choice of the response variable to be considered therefore appears as crucial when it is to highlight the behavioural responses of tested insects. This question should be further explored in future experiments if we are to describe finely the responses of these insects to slight differences of the proposed stimuli such as volatile compounds concentration (Knolhoff and Heckel2014).

Using different groups of maturation and sex, our experiments highlight the difficulty to demonstrate the preponderance of one of the proposed stimuli for all the four groups tested. Very few experiments with long-lived insects have tested the response of different groups although they can be really important in line with potential mass-trapping of the insect species (Cabrera Walsh et al. 2014). *Monochamus galloprovincialis* is considered as the most important vector of the pine wood nematode in Europe, since its introduction in Portugal (Robinet et al. 2011). Pine wiltdisease associated with pine wood nematode is one of the major European forest threats because of the difficulties in containing its spread and

eradicating the nematode after introduction (Økland et al. 2010) and in the little known spread at short and long distances of its beetle vector (Robinet et al. 2011, but see David et al. 2014). In this context, there is an important need for decision makers of estimates of the invasion risk of pine wood nematode in Europe but also of the ecology and life traits of its insect vector, in order to set up effective surveillance and control measures.

6. Acknowledgments

We are grateful to Fabrice Vétillard for his help during the set-up of the experimental room, and thank Bastien Castagnérol for helpful discussions in previous versions of this manuscript. Guillaume David was supported by a grant from French Ministry of Agriculture, Food and Forestry. This study and the contract of Brice Giffard were financed through a grant by the European Union Seventh Framework Programme FP7 via the Project REPHRAME (grant agreement 265483).

7. Bibliography

- Alagarmalai J, Grinberg M, Perl-Treves R, Soroker V (2009) Host Selection by the Herbivorous Mite *Polyphagotarsonemus latus* (Acari: Tarsonemidae). *J Insect Behav* 22:375–387
- Allison JD, Borden JH, Seybold SJ (2004). A review of the chemical ecology of the Cerambycidae (Coleoptera). *Chemoecology* 14:123–150
- Aluja M, Prokopy RJ (1993) Host odor and visual stimulus interaction during intratree host finding behaviour of *Rhagoletis pomonella* flies. *J Chem Ecol* 19:2671–2696
- Awmack CS, Leather SR (2002) Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. *Annu Rev Entomol* 47:817–44
- Barata EN, Araújo J (2001) Olfactory orientation responses of the eucalyptus woodborer, *Phoracantha semipunctata*, to host plant in a wind tunnel. *Physiol Entomol* 26:26–37
- Beyaert I, Hilker M (2014) Plant odour plumes as mediators of plant–insect interactions. *Biol Rev* 89:68–81

Brévault T, Quicili S (2007) Visual response of the tomato fruit fly, *Neoceratitis cyanescens*, to colored fruit models. *Entomol Exp Appl* 125:45–54

Cabrera Walsh G, Mattioli F, Weber DC (2014) A wind-oriented sticky trap for evaluating the behavioural response of the leaf-beetle *Diabrotica speciosa* to cucurbit extracts. *Int J Pest Manage* DOI: 10.1080/09670874.2014.897771

Campbell SA, Borden JH (2009) Additive and synergistic integration of multimodal cues of both hosts and non-hosts during host selection by woodboring insects. *Oikos* 118:553–563

Crawley MJ (2013) *The R book*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK

David G, Giffard B, Piou D, Jactel H (2014). Dispersal capacity of *Monochamus galloprovincialis*, the European vector of the pine wood nematode, on flight mills. *J Appl Entomol* 138:566–576

Finch S, Collier RH (2000) Host-plant selection by insects - a theory based on ‘appropriate/inappropriate landings’ by pest insects of cruciferous plants. *Entomol Exp Appl* 96:91–102

Giffard B, Jactel H, Corcket E, Barbaro L (2012) Influence of surrounding vegetation on insect herbivory: A matter of spatial scale and herbivore specialisation. *Basic Appl Ecol* 13:458–465

Ikeda T, Yamane A, Enda N, Matsuura K, Oda K (1981) Attractiveness of chemical-treated pine trees for *Monochamus alternatus* Hope (Coleoptera: Cerambycidae). *J Jap For Soc* 63:201–207

Kuroda K (2008) Physiological Incidences Related to Symptom Development and Wilting Mechanism. In: Zhao BG, Futai K, Sutherland JR, Takeuchi Y (eds) *Pine Wilt Disease*. Springer Japan, pp 204–222

Linsley EG (1959) Ecology of Cerambycidae. *Annu Rev Entomol* 4:99–138

Janz N, Thompson JN (2002) Plant polyploidy and host expansion in an insect herbivore. *Oecologia* 130:570–575

Janz N, Bergström A, Johansson J (2005) Frequency dependence of host plant choice within and between patches: a large cage experiment. *Evol Ecol* 19:289–302

Knolhoff LM, Heckel DG (2014) Behavioral assays for studies of host plant choice and adaptation in herbivorous insects. *Annu Rev Entomol* 59:263–278

Morewood WD, Hein KE, Katinic PJ, Borden JH (2002) An improved trap for large wood-boring insects, with special reference to *Monochamus scutellatus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Can J For Res* 32:519–525

Naves P, de Sousa E, Quartau JA (2006) Reproductive traits of *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera: Cerambycidae) under laboratory conditions. *Bull Entomol Res* 96:289–294

Naves PM, Camacho S, Sousa EM, Quartau JA (2007) Transmission of the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* through feeding activity of *Monochamus galloprovincialis* (Col., Cerambycidae). *J Appl Entomol* 131:21–25

Økland B, Skarpaas O, Schroeder M, Magnusson C, Lindelöw A, Thunes K (2010) Is eradication of the pinewood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*) likely? An evaluation of current contingency plans. *Risk Anal* 30:1424–1439

Paiva, MR, Mateus E, Santos MH, Branco MR (2011) Pine volatiles mediate host selection for oviposition by *Thaumetopoea pityocampa* (Lep., Notodontidae). *J Appl Entomol* 135:195–203

Pajares JA, Alvarez G, Ibeas F, Gallego D, Hall DR, Farman DI (2010) Identification and field activity of a male-produced aggregation pheromone in the pine sawyer beetle, *Monochamus galloprovincialis*. *J Chem Ecol* 36:570–583

Penas AC, Bravo MA, Naves P et al (2006) Species of *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 (Nematoda: Parasitaphelenchidae) and other nematode genera associated with insects from *Pinus pinaster* in Portugal. *Ann Appl Biol* 148:121–131

Prokopy RJ, Owens ED (1983) Visual detection of plants by herbivorous insects. *Annu Rev Entomol* 28:337–364

R Development Core Team (2013) R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria, ISBN: 3-900051-07-0

Radžiute S, Būda V (2013) Host feeding experience affects host plant odour preference of the polyphagous leaf miner *Liriomyza bryoniae*. *Entomol Exp Appl* 146:286–292

Robinet C, Van Opstal N, Baker R, Roques A (2011) Applying a spread model to identify the entry points from which the pine wood nematode, the vector of pine wilt disease, would spread most rapidly across Europe. *Biol Invasions* 13:2981–2995

Rojas JC, Wyatt TD (1999) Role of visual cues and interaction with host odour during the host-finding behaviour of the cabbage moth. *Entomol Exp Appl* 91:59–65

Soliman T, Mourits MCM, van der Werf W, Hengeveld GM, Robinet C, Oude Lansink AGJM (2012) Framework for modelling economic impacts of invasive species, applied to Pine Wood Nematode in Europe. *PLoS ONE* 7:e45505

Sousa E, Bravo MA, Pires J, Naves PM, Penas AC, Bonifácio L, Mota M (2001) *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda; Aphelenchoididae) associated with *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera; Cerambycidae) in Portugal. *Nematology* 3:89–91

Togashi K, Shigesada N (2006) Spread of the pinewood nematode vectored by the Japanese pine sawyer: modeling and analytical approaches. *Popul Ecol* 48:271–283

Vet L, Vanlenteren JC, Heymans M, Meelis E (1983) An air-flow olfactometer for measuring olfactory responses of hymenopterous parasitoids and other small insects. *Physiol Entomol* 8:97–106

Vicente C, Espada M, Vieira P, Mota M (2012) Pine Wilt Disease: a threat to European forestry. *Eur J Plant Pathol* 133:89–99

Titre : Etude des capacités de dispersion de *Monochamus galloprovincialis* vecteur du nématode du pin *Bursaphelenchus xylophilus*

Résumé : Le nématode du pin *Bursaphelenchus xylophilus*, originaire des Etats-Unis, est responsable de dépérissements massifs dans les forêts de pin des pays où il a été introduit. Il utilise comme vecteur un insecte du genre *Monochamus*, notamment *M. galloprovincialis* en Europe. L'objectif de cette thèse est de fournir des informations concernant les capacités de dispersion de ce coléoptère afin de mieux prédire le risque d'invasion. A l'aide d'expériences en manège de vol, nous avons montré que les adultes émergents, encore immatures, sont déjà en mesure de maintenir des vols soutenus. Ils peuvent parcourir une distance d'environ 500m par jour et les capacités de vol augmentent avec la prise de poids pendant la phase de maturation sexuelle. Il n'existe pas de compromis d'allocation de l'énergie entre fonctions de dispersion et de reproduction pendant cette période et nous proposons de qualifier ces insectes de "income breeder" et "capital disperser". A l'état mature *M. galloprovincialis* est capable de voler un total de 16km, avec des vols individuels d'environ 1km; ces performances augmentent avec l'âge et le poids des insectes. Le maintien des capacités de vol tout au long de la vie adulte de *M. galloprovincialis* conduit à proposer que les distances potentiellement parcourues dépendent surtout de la longévité de l'insecte. Dans une expérience d'élevage en conditions contrôlées nous avons montré que la vie adulte dure au moins 4 mois, augmentant quand les fluctuations thermiques sont atténuées. Ces résultats ont des implications pour la gestion de *B. xylophilus* en Europe puisqu'ils démontrent que la méthode d'éradication par coupe rase sur un rayon de 500m est probablement inopérante.

Mots clés : Capacités de vol, compromis d'allocation, âge, poids, longévité, changement climatique, *Pinus pinaster*, *Bursaphelenchus xylophilus*, espèce invasive

Title: Dispersal capacities of *Monochamus galloprovincialis* vector of the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*

Abstract: The pinewood nematode (PWN) *Bursaphelenchus xylophilus*, native to the USA, is responsible of the pine wilt disease, causing large economic losses in the pine forests of all countries where it has been introduced. It uses as vector an insect of the genus *Monochamus*, e.g. *M. galloprovincialis* in Europe. The objective of this thesis is to provide information about the dispersal abilities of, this beetle in order to better predict the spread rate of the PWN. Using flight mill experiments, we showed that immature adult beetles were able to fly since their emergence. The mean flight performance was ca. 500m per day, increasing with weight gain during the maturation period. There was no trade-offs in energy allocation between reproduction and dispersion. We therefore suggest that *M. galloprovincialis* is both "income breeder" and "capital disperser". Mature beetles were able to fly a total of 16km on average during their lifetime, with individual flights of ca. 1km. Flight performances increased with age and body weight, being equal for males and females. Because flight capacity remained constant across time, we suggested that the total distance potentially covered by beetles was mainly driven by their longevity. In a rearing experiment under controlled conditions we estimated the adult lifespan at 4 months. It was reduced under temperature regime with higher yearly thermal fluctuations. These results have important implications for the management of the PWN since they demonstrate that precautionary clear-cuts of 500m radius are likely to be ineffective in eradicating the disease.

Keywords: Flight capacities, allocation trade-off, age, body weight, longevity, climate change, *Pinus pinaster*, *Bursaphelenchus xylophilus*, invasive species

BioGeCo, UMR INRA 1202, 69 route d'Arcachon 33612 Cestas